

腫瘍免疫への応用を目的としたinterleukin2並びに同活性化T細胞の免疫分子論的研究

著者	西村 孝司
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	252
URL	http://hdl.handle.net/10097/46010

腫瘍免疫への応用を目的としたinterleukin2
並びに同活性化 T細胞の免疫分子論的研究

西 村 孝 司

目 次

第1章 緒 言	1
第2章 Interleukin 2による killer T細胞の長期培養	4
第1節 序 論	4
第2節 IL 2 の産生	4
第3節 各種リンパ系細胞による IL 2 の産生	5
第4節 Con A刺激T細胞による IL 2 の吸収	5
第5節 各種ラット及びマウスにおける IL 2 産生	6
第6節 同種白血病細胞に対する killer T細胞の長期培養	7
第7節 同系腫瘍に対する killer T細胞の長期培養	7
第8節 長期培養 killer T細胞の in vivo 抗腫瘍効果	8
第9節 考 察	8
第3章 Interleukin 2 の mitogenic 効果	10
第1節 序 論	10
第2節 ラットIL 2の精製	10
第3節 Interleukin 2の各種リンパ系細胞に対する mitogenic 効果	11
第4節 Interleukin 2の mitogenic 効果におよぼす α -methyl mannoside の影響	12
第5節 脾細胞中の IL 2 応答性細胞の解析	12
第6節 胸腺細胞亜群に対する interleukin 2 の mitogenic 効果	13
第7節 考 察	13
第4章 胸腺細胞亜群の interleukin 2 に対する応答性の違い	15
第1節 序 論	15
第2節 胸腺T細胞亜群の interleukin 2 に対する応答性	15
第3節 胸腺T細胞亜群の Con A に対する応答性	16
第4節 胸腺T細胞亜群の IL 2 及び Con A に対する応答性	16
第5節 胸腺T細胞亜群の Thy 1.2 抗原密度の違い	17
第6節 胸腺T細胞亜群の細胞表面マーカー	17
第7節 胸腺T細胞亜群の DNA 合成能	18
第8節 考 察	18
第5章 Lymphokine-activated killer (LAK)細胞の誘導と性状	20

第1節	序 論	20
第2節	マウス脾細胞からのLAK細胞の誘導	20
第3節	LAK細胞誘導のkinetics	21
第4節	killer 誘導因子とIL2との異同	22
第5節	LAK細胞の抗原特異性	22
第6節	LAK細胞の性状	23
第7節	LAK細胞誘導におけるマクロファージの関係	25
第8節	LAK細胞誘導におけるIFN- γ の関与	25
第9節	マウス腫瘍内浸潤リンパ球からのLAK細胞の誘導	26
第10節	ヒト胃癌内浸潤リンパ球からのLAK細胞の誘導	28
第11節	考 察	29
第6章	LAK細胞活性発現に必要なlymphokine-activated cell-associated (LAA)抗原の解析	31
第1節	序 論	31
第2節	LAK細胞に対するモノクローナル抗体の作製	31
第3節	モノクローナル抗体によるLAK活性の阻害	32
第4節	KBAモノクローナル抗体によるLAK細胞と癌細胞との結合阻害	33
第5節	KBA抗体の各種エフェクター細胞に対する影響	33
第6節	KBA抗体で認識されるLAA抗原の分布	34
第7節	IL2刺激によるLAA抗原の増強発現	35
第8節	LAK細胞とCTLにおけるLAA抗原発現の違い	36
第9節	LAA抗原の解析	37
第10節	考 察	38
第7章	IL2のin vivo効果	40
第1節	序 論	40
第2節	In vivo IL2活性測定方法の開発	40
第3節	In vivo 投与IL2のLAK細胞viabilityに対する影響	41
第4節	In vivo 投与IL2のLAK活性におよぼす影響	43
第5節	IL2の徐放的投与による血中IL2濃度の維持	43
第6節	IL2の徐放的投与によるLAK細胞のviability及び cytotoxicityの維持	44
第7節	考 察	45

第8章 IL 2 の癌免疫療法への応用	47
第1節 序 論	47
第2節 Recombinant IL 2 とLAK細胞の併用による抗腫瘍効果	48
第3節 MBL-2を用いた systemic adoptivechemoimmunotherapy モデルの確立	48
第4節 Recombinant IL 2 の徐放的投与による systemic adoptive- chemoimmunotherapy の増強	51
第5節 Recombinant IL 2 の腫瘍内投与による腫瘍増殖の抑制	52
第6節 考 察	53
第9章 総 括	55
第10章 実験材料及び方法	59
第1節 第2章付属実験	59
第2節 第3章付属実験	60
第3節 第4章付属実験	61
第4節 第5章付属実験	62
第5節 第6章付属実験	63
第6節 第7章付属実験	65
第7節 第8章付属実験	65
謝 辞	67
引用文献	68

本文中 で用いた略語

MHC,	major histocompatibility complex
Mφ,	macrophage
NK,	natural killer
IL 2,	interleukin 2
PHA,	phytohemagglutinin
LAK,	lymphokine-activated killer
BRM,	biological response modifier
γ-IL2,	recombinant interleukin 2
ACIT,	adoptivechemoimmunotherapy
Con A,	concanavalin A
MMC,	mitomycin C
MLTR,	mixed-lymphocyte tumor reaction
α-MM,	α-methyl D-mannoside
CSF,	colony-stimulating factor
IFN,	interferon
PNA,	peanutsagglutinin
SIT,	spontaneous incorporation of ³ H-thymidine
IL3,	interleukin 3
TIL,	tumor-infiltrating lymphocytes
LGL,	large granula lymphocytes
BRK,	broad-reactive killer
azido-FDA,	azido fluorescein diacetate
CTL,	cytotoxic T lymphocytes
LAA antigen,	lymphokine-activated cell-associated antigen
FITC,	fluoresceinisothiocyanate
PI,	propidium iodide
SDS,	sodium dodecyl sulfate
PAGE,	polyacrylamidegel electrophoresis
CY,	cyclophosphamide

第 1 章 緒 言

Jerne の免疫ネットワーク仮説によれば、「生体は自己抗原に対応したクローンを抑制制御する過程を通じて、新しいクローンを生みだし、無限に近い抗原系に対応したクローンから成る免疫系を完成できる」という。¹⁾ この仮説が全て正しいか否かは未だ証明されていないが、免疫担当 T 細胞上の抗原レセプターの存在が明らかにされた現在、非自己抗原に対応するレセプターを有した T 細胞が中心となり、自己の Major histocompatibility complex (MHC) の認識を基盤にして、複雑かつ功妙な免疫ネットワークを形成し、異物の排除を行っていることは、多くの研究者により確かめられている事実である。²⁻⁷⁾

免疫応答は本来、マクロファージ (Mφ) の貪食作用に代表されるように、アメーバの飲食運動やイソギンチャクの異物に対する収縮運動に類似の非常に単純な異物排除機構として成立したものである。しかし、進化の過程で対応抗原が複雑化し、これに対応すべく T 細胞や B 細胞が生まれ、さらには、生体の免疫応答の恒常性を保つべく、各種の T 細胞亜群 (helper T 細胞, suppressor T 細胞, killer T 細胞) が生まれたものと考えられる。

このような異物排除機構として生まれた免疫機構を癌の治療へ応用しようと考えた場合、一つの大きな疑問が生ずる。それは、「生体は本当に免疫監視機構により、自己の正常細胞から生じた腫瘍を非自己と見なし免疫応答を示すのか？」ということである。癌細胞に存在する oncogene を正常細胞に移入し、新しく発現される癌抗原に対して、免疫担当細胞が反応を示すという証明が成されていない現在、大手をふって「yes」とこの問に答えることはできない。しかし、モノクローナル抗体によって、正常細胞には存在しない抗原が癌細胞表面に存在することや、⁸⁾ 自己腫瘍に浸潤したリンパ球群の中に、自己腫瘍に対して cytotoxicity を示す killer T 細胞⁹⁾ が存在するという事実は、癌細胞には正常細胞とは異なった抗原が存在し、担癌宿主の免疫担当細胞は自己腫瘍に対する免疫応答を示すことができるということを強く示唆する。

生体の免疫調節機構は周知のように、B 細胞により産生される抗体を介した体液性免疫と、killer T 細胞に代表される、細胞そのものによる異物排除である細胞性免疫から成り立っている。癌の免疫療法を考えた場合にも、この二つの方向が考えられ、一つはモノクローナル抗体を使用した癌のミサイル療法であり、¹⁰⁾ また、今一つは、抗腫瘍エフェクター細胞の活性化、または移入により担癌宿主の抗腫瘍能を高め癌の治療を期待する方法である。¹¹⁾

筆者は後者の立場をとり、担癌宿主において、いかにして効果的に自己腫瘍に対する抗腫瘍活性発現を促すかを究極的目的として実験にとりくんだ。

1970年代、腫瘍免疫における主役はkiller T細胞であると考えられ、腫瘍に対する特異的免疫に関する研究がなされた。^{12, 13)}しかし、自己腫瘍に対するkiller T細胞の誘導は簡単なものではなく、また誘導されたとしても、その活性は低く、癌の治療に用いるだけの強い活性を有したkiller細胞を大量に得ることは不可能であった。また一方では、BCGに始まる、いわゆる免疫賦活剤による非特異的な免疫療法も押し進められ、macrophage (Mφ)^{14, 15)}やnatural killer (NK)細胞^{16, 17)}が注目を浴びた。しかし、いずれの場合にも期待されたほどの成果を上げることはできず、細胞性免疫による癌の免疫療法は暗黒の時代へと突入した。

この暗黒の中に一点の光を投げかけたのが1977年の「interleukin 2 (IL 2)によってkiller T細胞を長期培養できる」という報告であった。¹⁸⁾従来、T細胞はin vitroの条件下では長期培養することは不可能であると考えられており、当然のことながら、腫瘍に対してcytotoxicityを示すkiller T細胞をin vitroで培養することは困難なことであった。しかし、1976年、Morganらは、ヒト末梢血リンパ球をphytohemagglutinin (PHA)で刺激することによって、T細胞を分裂増殖させることができる因子、IL 2が産生されることを報告した。¹⁹⁾GillisとSmithは、この事実注目し、翌1977年、ヒト白血病細胞に対するkiller T細胞をIL 2を用いて長期培養することに成功したことを報告した。

IL 2発見の意義は、もちろん、B細胞の活性化機構の解明に比べ遅れをとっていた、T細胞活性化のメカニズムが一個のT細胞クローンと物質のレベルで解明が進むようになったことにある。しかし、もう一つの重要な意義は、細胞性免疫による癌の免疫療法実現の夢を再び免疫学者たちに思い起こさせてくれたことにある。

IL 2はhelper T細胞由来の免疫調節因子であり、in vitroにおいては、(1)T細胞の分裂増殖の促進、²⁰⁾(2)killer T細胞の誘導の増強、²¹⁾(3)抗体産生の増強、²²⁾(4)分化の誘導、²³⁾(5)lymphokine-activated killer (LAK)細胞の誘導等²⁴⁾の様々な免疫調節機能を有している。従って、もしIL 2がbiological response modifier (BRM)として、in vivoにおいても作用しうることができれば、免疫抵抗力の低下した担癌生体の抗腫瘍活性を人為的に制御できるかもしれない。

そこで筆者は、IL 2のin vitro及びin vivoにおける作用を明らかにし、さらにはIL 2が癌の免疫療法へ応用可能であるか否かの知見を得るために本研究を行った。

第2章ではIL 2産生とIL 2を用いたkiller T細胞の長期培養について述べ、第3、4章では、IL 2のmitogenicな効果とIL 2応答性細胞のontogenyについて述べる。また第5章ではIL 2を用いたマウス及びヒトLAK細胞の誘導と性状について論述し、第6章ではマウスLAK細胞に反応性のモノクローナル抗体を用いたLAK細胞の腫瘍認識機構の解明について述べる。

筆者によっても、IL 2 の *in vitro* における種々の生理活性については明らかにされたものの、癌の免疫療法に IL 2 を応用することを考えた場合、まず始めに、IL 2 が *in vivo* においても *in vitro* と同様の作用を示し得るか否かについて確かめなければいけない。しかし、*in vivo* の IL 2 活性を測定する方法は、Cheever らの *congeneic* マウスを用いた方法²⁵⁾しかなく、さらに簡便な方法の確立が必要とされる。そこで、第 7 章では、筆者が新しく開発した *in vivo* IL 2 活性の測定法について述べ、さらに、この方法を用い、どのような投与方法が、最も効果的な IL 2 の *in vivo* 作用発現のために良いかについても論述する。

当初は、*in vivo* の実験においては大量の IL 2 を必要とするため、IL 2 の癌免疫療法への応用を検討することも非常に困難であった。しかし、近年の遺伝子組み換え技術の進歩により、IL 2 の c-DNA も決定され、現在では純粋な recombinant IL 2 (γ -IL 2) が大量に供給されるようになった。^{26, 27)} 第 8 章では、 γ -IL 2 と LAK 細胞の併用による局所での癌免疫療法モデルの確立と、 γ -IL 2 の systemic な adoptive-chemoimmunotherapy (ACIT) の増強効果について述べ、本研究の課題である「IL 2 が癌の免疫療法に応用可能であるか否か」について考察する。

第 2 章 Interleukin 2 による killer T 細胞の長期培養

第 1 節 序 論

腫瘍免疫における *in vivo* エフェクター細胞としては killer T 細胞, M ϕ , NK 細胞, K 細胞等が知られており, その中でも特に腫瘍細胞に対して特異的な cytotoxicity を示す killer T 細胞が重要な役割を演じると考えられてきた。事実, ある系においては killer T 細胞の移入によって癌の治療が可能であることも報告されている。²⁷⁻³⁰⁾ しかしながら, 一般に, 同系腫瘍に対する killer T 細胞の誘導は簡単なものではなく, 強い活性を有したエフェクター細胞を大量に得ることはできなかった。

しかし, 1976 年, Morgan らはヒト末梢血リンパ球を PHA で刺激することによって, T 細胞の分裂増殖を促す可溶性因子, interleukin 2 が産生され, IL 2 を用いることによって *in vitro* での T 細胞の長期培養が可能であることを示した。¹⁹⁾ Gillis と Smith はこの現象をさらに応用し, ヒト白血病細胞に対する killer T 細胞を *in vitro* で長期培養できることを報告し, IL 2 の癌免疫療法への応用性を強く示唆した。¹⁸⁾

本章では, ラット, マウス IL 2 の産生について基礎的な検討を試み, その後に, マウス同種白血病細胞 RADA1 及び同系腫瘍 BMC2 に対する killer T 細胞の長期培養についても述べ, 長期培養した killer T 細胞の抗腫瘍活性について検討する。

第 2 節 IL 2 の産生

ラット脾細胞 ($5 \times 10^6 / \text{ml}$) を concanavalin A (Con A) で刺激 48 時間後の培養上清中の IL 2 活性を測定した。IL 2 活性測定に用いた IL 2 依存性 T 細胞クローン T572 は C57BL/6 マウス Con A blast 由来のものである。T572 (10^5) を RPMI 培地, Con A 添加 RPMI 培地, およびラット脾細胞の培養上清を加えて培養した場合には, いずれの場合にも経時的な著しい細胞数の減少が認められた。これに対し, Con A 刺激ラット脾細胞培養上清を加えた場合には 4 日間で約 10 倍に T572 が分裂増殖することが確認された (図 2-1)。

T 細胞増殖活性を有した IL 2 の産生 kinetics について次に検討したところ, IL 2 産生は Con A 刺激後 10 時間後に既に認められ, 48 時間後をピークとし, 以後経時的に減少することが明らかとなった (図 2-2)。

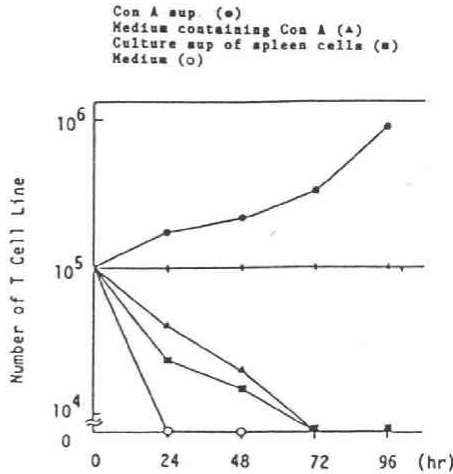


Fig. 2-1. The growth of T572 cells
by culture with TCGF.

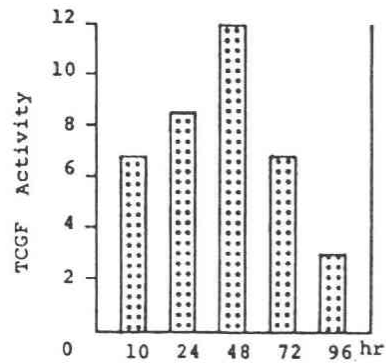


Fig. 2-2. The kinetics of
TCGF (IL 2) production.

第3節 各種リンパ系細胞によるIL 2の産生

SDラット脾細胞, リンパ節細胞, 及び胸腺細胞を $10 \mu g/ml$ のCon Aで刺激, 48時間後の培養上清中のIL 2活性を測定したところ, 脾細胞, リンパ節においては強い活性を有したIL 2の産生が認められたが, 胸腺細胞においては全くIL 2の産生が認められなかった(図2-3)。

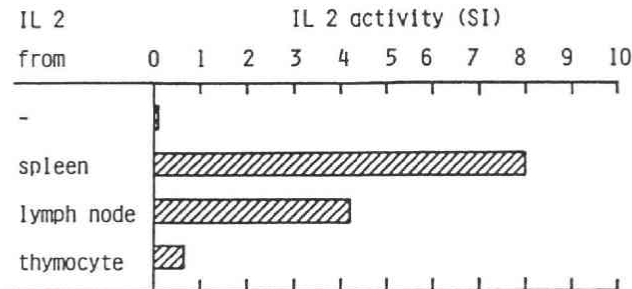


Fig. 2-3 Production of IL 2 in various lymphoid cells.

第4節 Con A刺激T細胞によるIL 2の吸収

Con A刺激24時間後のマウスT細胞(5×10^7)とIL 2を $23^\circ C$ で1時間 incubate し, Con A blastが細胞表面のレセプターを介してIL 2を吸収しうるか否かについて検討した。その結果, 対照細胞として用いたEL 4白血病によっては全くIL 2の吸収は認められなかったが, Con A blastによって, IL 2活性は殆んど吸収された(図2-4)。

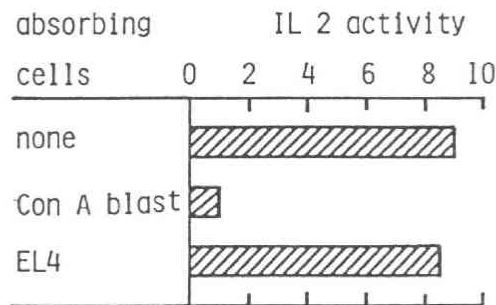


Fig. 2-4 Absorption of IL 2 by Con A blast

第 5 節 各種ラット及びマウスにおける IL 2 産生

各系統のラット及びマウス脾細胞を Con A で刺激し、48 時間後の培養上清を得、各動物の IL 2 産生能を比較検討した。その結果、ラットにおいては、いずれの場合にも、培養上清中に強い IL 2 活性が認められたが、マウス脾細胞培養上清中には殆んど IL 2 活性が認められなかった(表 2-1)。しかし、マウス IL 2 の産生 kinetics を調べた結果、Con A 刺激 20 時間後にマウス IL 2 の産生は最大に達し、以後、急激に減少することが明らかとなった(図 2-5)。マウス IL 2 とラット IL 2 の産生の kinetic が異なるのは、マウス脾細胞とラット脾細胞の Con A に対する応答性の違いに起因すると思われる。すなわち、マウス脾細胞はラット脾細胞に比べ Con A に対して高い応答性を示し、Con A 刺激 20 時間後には IL 2 レセプターを保有した細胞の活発な分裂増殖が開始され、培養上清中の IL 2 を消費するため、反応 48 時間後のマウス脾細胞培養上清中には、ラットの場合とは異なり、IL 2 活性が検出できないものと思われる。

Table 2-1. IL 2 production in various mouse and rat strains.

TCGF from	³ H-TdR Incorporation of Cytotoxic T Cell Line
CD Rat	5606.0 ± 47
Wistar Rat	4472.7 ± 946
Donryu Rat	3799.5 ± 106
C57BL/6 Mouse	823.7 ± 131
BALB/c Mouse	755.0 ± 162
A/J Mouse	654.0 ± 138
None	508.7 ± 26

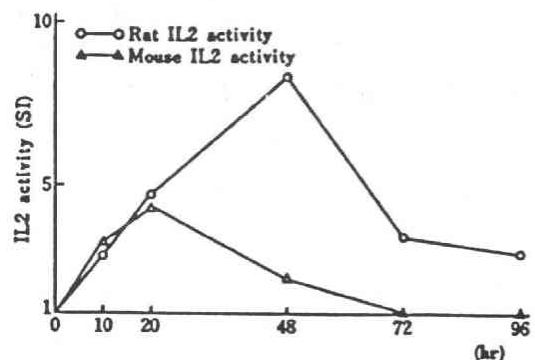


Fig. 2-5. The kinetics of IL 2 production

第6節 同種白血病細胞に対する killer T細胞の長期培養

C57BL/6 マウスをA系マウス由来白血病細胞 RADA1 で二回免疫し, RADA1 に特異的に作用する killer T 細胞を誘導し, IL 2 の存在下で長期培養することを試みた。その結果, killer T 細胞は5日間で約10倍の割合で分裂増殖を繰り返し, 5ヶ月間培養しても, その cytotoxicity は失なわれることなく, むしろ増強されて維持された(図2-6)。

また, killer T 細胞誘導の際の抗原量の killer T 細胞長期培養におよぼす影響について検討したところ, killer T 細胞誘導の際の抗原量が多いほど, 強い活性を維持したまま killer T 細胞を長期間培養することができた(表2-2)。

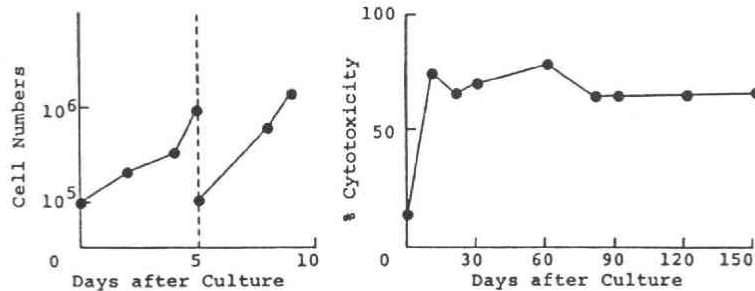


Fig. 2-6. Long-term culture of cytotoxic T lymphocytes against alloantigen.

Table 2-2. Effect of antigen doses on long term culture of CTL.

Immune T Cells from C57BL/6 immunized with various number of RADAL Cells	Cytotoxicity(%) of immune T Cells grown in TCGF			
	Days	0	15	25
2.5 x 10 ⁷		60.1	66.6	59.3
1.0 x 10 ⁷		32.6	24.8	0
5.0 x 10 ⁶		27.7	11.0	0
1.0 x 10 ⁶		21.6	0	0

C57BL/6 mice were immunized with various number of RADAL cells and immune T cells were obtained from spleen 12 days after immunization. Cytotoxic activity of each CTL grown in TCGF was measured varying days after culture.

第7節 同系腫瘍に対する killer T細胞の長期培養

C57BL/6 マウス脾細胞を mitomycin C (MMC) 処理した同系腫瘍 BMC 2 と混合し, 6 日間の mixed-lymphocyte tumor reaction (MLTR) を行い BMC 2 に対する killer T 細胞を誘導し, IL 2 の存在下で長期培養できるか否かを検討した。その結果, アロ抗原に対する killer T 細胞の場合とは異なり, 同系腫瘍 BMC 2 に対する killer T 細胞の長期培養は非常に

困難であり、IL 2 の存在下で培養20日後には著しく cytotoxicity が減少した（図 2-7）。

第 8 節 長期培養 killer T 細胞の in vivo 抗腫瘍効果

IL 2 の存在下、14日間にわたり in vitro で維持された BMC 2 に対する killer T 細胞が実際に、in vivo においても抗腫瘍効果を示しうるか否かを wimm テストを用いて検討した。

C57BL/6 マウスに 10^4 個の BMC 2 を SC 接種した場合、50日後には腫瘍の大きさは23mmに達した。また、 10^4 個の BMC 2 に 2×10^6 個の正常マウス脾細胞を混じて SC 接種した場合にも腫瘍の増殖は抑制されず、むしろ増強された。これに対して、in vitro で培養維持された killer T 細胞株を200:1 の割合で BMC 2 に混じて皮下接種したところ、腫瘍の増殖は著明に抑制され、1/3 のマウスにおいて腫瘍の増殖が認められたものの、他の2/3 のマウスは BMC 2 を完全に拒絶し、長期培養 CTL 株の in vivo における抗腫瘍活性が確認された（図 2-8）。

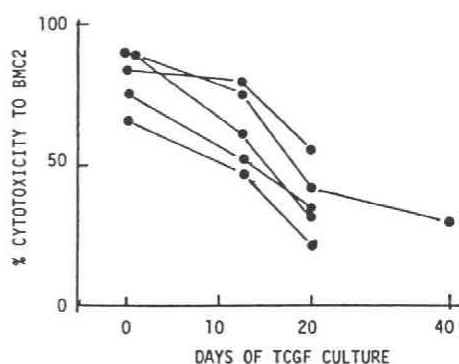


Fig. 2-7. Long-term culture of CTL against syngeneic tumor cells.

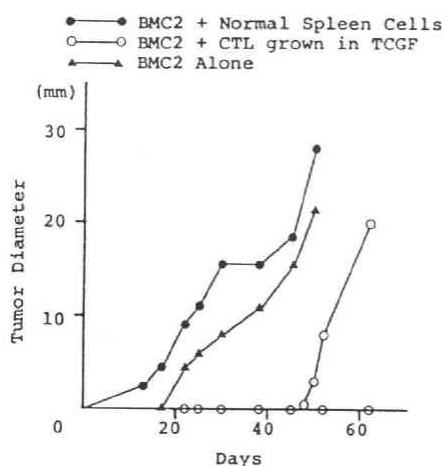


Fig. 2-8. Inhibition of tumor growth in vivo by long-term cultured CTL.

第 9 節 考 察

IL 2 の産生はマウスおよびラットで異なり、マウスにおいては Con A 刺激 20 時間後に、又ラットでは48時間後にピークに達し、以後急激に減少した。

Con A で活性化された T 細胞 Blast と IL 2 を incubate することによって、IL 2 の活性が消失することにより、Con A 刺激 T 細胞膜表面には IL 2 に対するレセプターが存在すると考えられる。また、Con A 幼若化反応がピークに達する時間（マウスでは48時間；ラットでは72時間）においては、培養上清中には強い IL 2 活性が認められないことにより、Con A で刺激された T 細胞は helper T 細胞から放出される IL 2 を、レセプターを介してうけとり分裂増殖し、培養上清中から IL 2 が消失した段階で死滅すると思われる。³¹⁾

活性化T細胞におけるIL 2レセプターの存在は、現在、モノクローナル抗体によっても確かめられている。^{32, 33)}また淀井らは、IL 2レセプターのアミノ酸配列までも明らかにし、分子量約60KのIL 2レセプターがT細胞の分裂に不可欠な分子であることを示している。³⁴⁾

IL 2は種を越えて作用することが報告されているが、本実験においてもラットIL 2は種を越えてマウスkiller T細胞に作用し、長期培養を可能にすることが示された。

Killer T細胞の活性はIL 2の存在下で培養することによって減少するどころか、むしろ増強され、約8ヶ月にわたり、強いcytotoxicityを維持したまま培養することができた。この事実にはRosenbergら²⁰⁾によっても報告されており、IL 2の存在下でkiller T細胞の活性が何故増強されるかについては、以下の2つの可能性が考えられる。①IL 2が抗原特異的なkiller T細胞1個あたりの活性を増強させる。②IL 2の存在下でkiller T細胞を長期培養する際に、非特異的な活性化がおこり、異なったkiller T細胞が分裂増殖する、という理由である。後述するように、IL 2にはリンパ球を刺激して幅広い抗原特異性を有したLAK細胞を誘導する活性もあることが証明されており、²⁴⁾筆者は、長期培養killer T細胞の活性増強は、②のLAK細胞の混入によるものであると考えている。

ある抗原量以上でマウスを免疫し、できるだけ多くのkiller T細胞を誘導し、その後IL 2の存在下で培養した場合には長期間にわたりkiller T細胞の活性を維持することができたが、killer T細胞誘導の際の抗原量が少ない場合には、長期間killer活性を維持することはできなかった。この現象は、killer T細胞誘導の際の抗原量が少ない場合には誘導されるkiller T細胞数が少なく、IL 2の存在下で培養中に、他の活性を有しないT細胞の分裂増殖によって希釈されるためであると考えられる。

同系腫瘍BMC 2に対するkiller T細胞の長期培養が困難であるのも、おそらくは、同系腫瘍の抗原性が低く、syngeneic MLTRで誘導されるkiller T細胞数が少ないためであると思われる。

IL 2によって長期培養されたkiller T細胞はin vivoにおいても強い抗腫瘍活性を示したことから、今後、IL 2が癌の免疫療法に応用可能であることが強く示唆された。しかし、より強く、より抗原特異性が高いkiller T細胞株を得るためには、培養初期でのクローニングが必要であると思われる。³⁵⁾

第 3 章 Interleukin 2 の mitogenic 効果

第 1 節 序 論

抗原やレクチンの刺激によって helper T 細胞から放出される IL 2 は、^{36, 37)} 抗原刺激により、IL 2 レセプターを獲得した T 細胞や NK 細胞のみに作用し、³⁸⁻⁴⁰⁾ 未刺激 T 細胞には作用しないと考えられてきた。^{31, 41)}

抗原刺激を受けた T 細胞が多くの IL 2 レセプターを保有し、より早く IL 2 に反応し、分裂増殖することは多くの研究者によって確かめられている。しかしまた、未刺激 T 細胞膜表面上にも、わずかながら IL 2 レセプターが存在していることも確認されており、大量の IL 2 刺激によりこれら未刺激 T 細胞の分裂増殖が促される可能性もある。

そこで筆者は、ラット IL 2 を Sephacryl S-200 を用いたゲルろ過法にて精製し、ラット IL 2 の性状を明らかにするとともに、この精製したラット IL 2 のマウスリンパ系細胞に対する mitogenic 効果について検索し、IL 2 が未刺激 T 細胞の分裂を引き起こすことができるのか否かについて検討した。⁴²⁾

第 2 節 ラット IL 2 の精製

ラット脾細胞 ($5 \times 10^6 / \text{ml}$) を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の Con A で刺激 48 時間後の培養上清を集め、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分画を行ったところ、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50-90% 飽和濃度の画分に IL 2 活性が回収された。この画分をさらに、Sephacryl S-200 ゲルろ過にて分離し、ラット IL 2 の分子量を推定した。その

結果、分子量約 22000~26000 の画分に T 細胞株、T572 の増殖を促進するラット IL 2 が存在することが明らかとなった (図 3-1)。

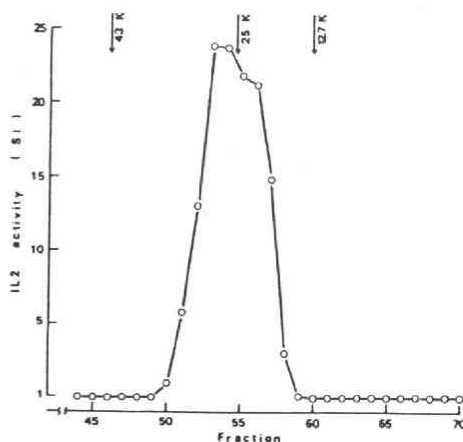


Fig. 3-1. Elution profile of IL 2 by Sephacryl S-200 column chromatography. IL 2 activity (SI) was calculated in the following equation: $SI = \text{cpm in culture of T572 cells with a fractionated sample} / \text{cpm in culture of T572 alone}$.

第3節 Interleukin 2 の各種リンパ系細胞に対するmitogenic効果

マウス脾細胞, リンパ節細胞および胸腺細胞を IL 2 の存在下で培養し, これらの細胞の IL 2 に対する応答性を検討した。その結果, 脾細胞, リンパ節細胞は IL 2 に対して強く反応し, 分裂増殖するが, 胸腺細胞は全く IL 2 に対して応答性を示さなかった (図3-2)。

図3-3は, 各種リンパ球の IL 2 に対する応答性の kinetics を調べたものであるが, この場合にも, リンパ節細胞・脾細胞は培養開始48, 72時間後に強い IL 2 応答性を示したが, 胸腺細胞はいずれの時間においても IL 2 に対する応答性を示さなかった。

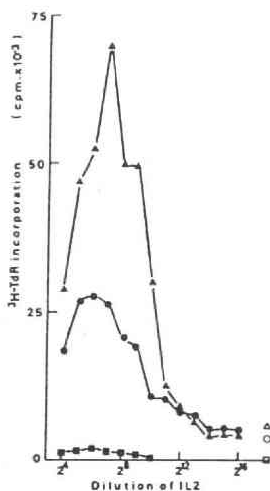


Fig. 3-2. Mitogenic effect of IL 2 against lymphoid cells. Spleen cells, lymph node cells and thymocytes were cultured for 32 h at 37°C in the presence (+) or absence (-) of serially diluted purified IL 2 and then pulsed with ³H-TdR for 4 h.
○, spleen cells (-); ●, spleen cells (+); △, lymph node cells (-); ▲, lymph node cells (+); □, thymocytes (-); ■, thymocytes (+).

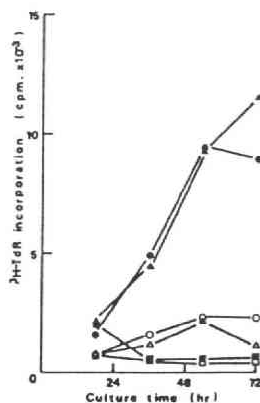


Fig. 3-3. Kinetics of blastogenic responses of lymphoid cells to IL 2. Spleen cells, lymph node cells and thymocytes were cultured at 2.5×10^4 cells/ml in the presence (+) or absence (-) of IL 2 and then pulsed the final 4 h with ³H-TdR (0.5 μ Ci/well).
○, spleen cells (-); ●, spleen cells (+); △, lymph node cells (-); ▲, lymph node cells (+); □, thymocytes (-); ■, thymocytes (+).

第4節 Interleukin 2 の mitogenic 効果におよぼす α -methyl mannoside の影響

Sephacryl S-200ゲルろ過法を用いて精製した IL 2 画分には、IL 2 作製の際に用いた Con A は混在してないと考えられる。しかし、IL 2 の mitogenic 効果がわずかに混入する Con A のためではないということをさらに明らかにするために、Con A の競合阻害剤である α -mannoside を用いて検討した。

α -MM の添加によって、Con A によるマウス脾細胞の幼若化反応は完全に抑制された。しかし、IL 2 刺激による脾細胞の分裂は、 α -MM の添加によって全く影響をうけなかった (表 3-1)。この結果から、IL 2 の mitogenic 効果は混入する Con A によるものではなく、IL 2 そのものによるものであることが示された。

Table 3-1. Effect of α -methyl-mannoside (α -MM) on the mitogenic activity of IL 2 and Con A^a

Stimulator	α -MM ^b	³ H-TdR incorporation (cpm) ^c
-	-	2780 \pm 157
Con A	-	116 868 \pm 6800
Con A	+	2358 \pm 186
IL 2	-	14 932 \pm 539
IL 2	+	14 512 \pm 331

^a Aliquots (0.2 ml) of spleen cell suspension (2.5×10^6 /ml) were cultured in the presence or absence of Con A (0.5 μ g/well) or IL 2 (10 μ l/well).

^b α -MM was added to medium at a concentration of 100 mM.

^c The cells were cultured for 32 h and then pulsed with ³H-TdR (0.5 μ Cl) for 4 h. Each datum represents the mean \pm SE of triplicate samples.

第5節 脾細胞中の IL 2 応答性細胞の解析

IL 2 の画分中には種々のリンフォカインが混在している可能性があり、IL 2 の刺激によって、T細胞以外の細胞の分裂が引き起こされていることも考えられる。そこで、抗 Thy 1.2 抗体と補体を用いて、IL 2 の mitogenic な効果をうけ分裂増殖する細胞が T細胞であるか否かについて検討した。その結果、マウス脾細胞を抗 Thy 1.2 抗体と補体で処理することにより、Con A に対する応答性、IL 2 に対する応答性、いずれもが消失することが明らかとなった。従って、IL 2 に反応して分裂増殖する細胞は T細胞であり、colony stimulating factor (CSF) 等の影響で分裂増殖した他の M ϕ 等の細胞ではないことが確認された (表 3-2)。

Table 3-2. Characterization of IL 2-responding cells in spleen^a

Treatment ^b	Stimulator	³ H-TdR incorporation (cpm) ^c
None	—	2390 ± 206
	Con A	91 509 ± 2150
	IL 2	9443 ± 118
Anti-Thy 1.2 + C	—	1551 ± 278
	Con A	1712 ± 11
	IL 2	1808 ± 126
Calone	—	2060 ± 57
	Con A	88 970 ± 3200
	IL 2	9242 ± 85

^a Aliquots (0.2 ml) of a spleen cell suspension (2.5×10^6 /ml) were cultured in the presence or absence of Con A ($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$) or IL 2 ($10 \mu\text{l}/\text{well}$).

^b Spleen cells were treated with monoclonal anti-Thy 1.2 plus complement for 30 min at 37°C .

^c The cells were cultured for 32 h at 37°C and then pulsed with ³H-TdR for 4 h. Each datum represents the mean ± SE of triplicate samples.

第 6 節 胸腺細胞亜群に対する interleukin 2 の mitogenic 効果

前節（第 3 節）で述べたように、未分画胸腺細胞は IL 2 に対して全く応答性を示さなかった。しかし、胸腺細胞中には Con A 等に応答性を示す細胞群もわずかながら存在することが知られており、胸腺細胞をなんらかの方法で分画し、その IL 2 に対する応答性を検討することは興味深い。

筆者は percoll 不連続密度勾配遠心法を用いて、胸腺細胞を三つの異なる細胞群に分離し、それらの IL 2 の応答性を検索した。その結果、Fr2, Fr3 の細胞群は未分画胸腺細胞と同様に、全く IL 2 に対する応答性を示さなかったが、低比重画分の Fr1 の細胞は、脾細胞等と同様の高い IL 2 に対する応答性を示した（図 3-4）。

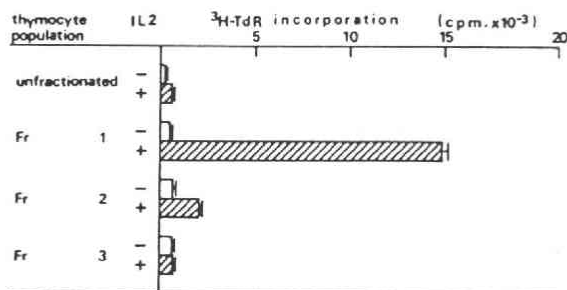


Fig. 3-4. Blastogenic response of thymocyte subpopulations. Aliquots (0.2 ml) of thymocyte subpopulations (2.5×10^6) were cultured with or without IL 2 ($10 \mu\text{l}/\text{well}$) for 32 h at 37°C and then pulsed with ³H-TdR ($0.5 \mu\text{Ci}/\text{well}$) for 4 h.

第 7 節 考 察

ラット IL 2 は Sephacryl S-200 を用いたゲルろ過法により、分子量 22000~26000 のタンパク質であることが判明した。この結果は、Watson らによって報告されている分子量 15000 であるという知見と異なるものであった。²²⁾ しかし、最近ラット IL 2 の再検討が Sabato ら⁴³⁾ によってなされ、筆者の結果は彼らと一致するものであった。

ゲルろ過で精製した IL 2 は、マウス脾細胞、リンパ節細胞に対して強い mitogenic 活性を

示した。このmitogenic 活性は IL 2 作製の際に用いた、Con A の混在でないことは α -MM を用いた阻害実験から明らかにされた、また、IL 2 分画には IL 2 の他のリンフォカイン、たとえば CSF 等が混在していることが知られているため、⁴⁴⁾ IL 2 分画の添加によって、M ϕ 等の T 細胞以外の細胞が分裂増殖する可能性もあるが、抗 Thy 1.2 抗体と補体を用いた実験から、ゲルろ過精製 IL 2 に対して応答する細胞は T 細胞であることが明らかとなった。

末精製胸腺細胞は、脾細胞、リンパ節細胞とは異なり、IL 2 に対して全く応答性を示さなかった。しかし、胸腺細胞には様々な分化過程の T 細胞が存在しており、⁴⁵⁾ 何らかの手段を用いて胸腺細胞を分画することによって、IL 2 に応答性を示す T 細胞亜群が得られることが予想された。筆者は、percoll 不連続密度勾配を用い、マウス胸腺細胞を、大きさ、Con A 応答性、IL 2 応答性の異なる 3 つの細胞群に分離する方法を確立した。この方法を用いることによって、低比重画分の胸腺細胞亜群が末梢リンパ球と同等の IL 2 に対する応答性を示すことも明らかとされた。

従来、BSA 不連続密度勾配等を用いて、低比重画分の胸腺細胞は胸腺髄質に存在する、比較的分化の進んだ T 細胞であると考えられている。⁴⁶⁾ 従って、IL 2 に強い応答性を示す胸腺細胞がこれらの細胞と同等の細胞表面マーカーを有しているか否かについては、さらに興味をもたれるが、この点については次章で論述する。

IL 2 の mitogenic 活性は、最近入手されるようになった recombinant IL 2 によっても確認されており、IL 2 画分に混在する他の factor の影響である可能性は完全に否定できる。

IL 2 の mitogenic 効果発現の機序としては、(1)培養に用いる FCS と IL 2 の協同作用、(2) IL 2 そのものにより IL 2 レセプターが誘導され、IL 2 の signal をうけとる、(3) IL 2 が脾などのリンパ球群を活性化し、IFN 等のリンフォカインを産生させ、IL 2 レセプターの発現を促し、その後分裂増殖させる等の可能性が考えられるが、この点については現在検討中である。

第4章 胸腺細胞亜群の interleukin 2 に対する 応答性の違い

第1節 序 論

胸腺はT細胞の分化において欠くことができない臓器であり、胸腺からT細胞がどのような機序で分化をとげ、末梢のリンパ系臓器に導入されるかは未だ解決されていない重要な問題である。

1980年、WagnerらはIL 2はT細胞の分裂増殖を促すだけではなく、T細胞の分化を調節しうる因子であることを報告した。すなわち、彼らは未熟な $Ly 2, 3^+$ 胸腺細胞をIL 2の存在下で抗原刺激することによって、末梢リンパ球からと同様にkiller T細胞が誘導できることを示した。²³⁾

しかし、一方では、IL 2は $Ly 1^+, 2^-$ の成熟胸腺T細胞のみに作用し、 $Ly 2, 3^+$ 胸腺細胞の分化を動かすことはできないとの報告もある。⁴⁷⁾ IL 2のT細胞分化における役割を明確にするためにも、IL 2の胸腺細胞に対する作用機作について、さらに検討することが必要であると思われる。

筆者は、前章において、IL 2はマウス脾細胞、リンパ節細胞のみならず、胸腺中のあるT細胞亜群に対してもmitogenicな効果を示すことを明らかにした。

そこで本章では、percoll不連続密度勾配で分画した三つの胸腺細胞群がIL 2やCon Aの刺激に対して、どのような応答性を示し、またこれらの細胞群がどのような細胞表面マーカーを有しているかについて詳細に検討した。⁴⁸⁾

第2節 胸腺T細胞亜群の interleukin 2 に対する応答性

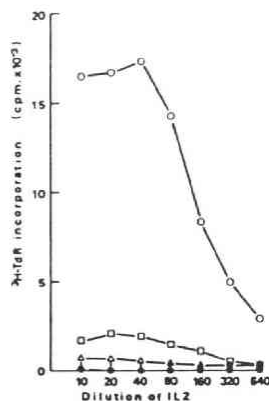


Fig. 4-1. Different response of thymocyte subpopulations to IL 2. Aliquots (0.2 ml) of thymocyte subpopulations (2.5×10^6 cells/ml) were cultured serially diluted IL 2 for 32 h at 37°C and pulsed with $^3\text{H-TdR}$ ($0.5 \mu\text{Ci/well}$) for 4 h.
□, unfractionated thymocytes; ○, Fr 1 cells; ▲, Fr 2 cells; ●, Fr 3 cells.

Percoll 不連続密度勾配遠心法でFr1, Fr2, Fr3の三つの胸腺T細胞亜群に分画し、種々の濃度のIL 2の存在下で培養し、各細胞群のIL 2に対する応答性を検討した。その結果、未分画胸腺細胞はIL 2に対して全く応答性を示さなかったが、Fr1の胸腺細胞はIL 2の濃度依存的に

高い応答性を示した。しかし、Fr2, Fr3 の細胞群はいずれの濃度の IL 2 の存在下においても全く分裂増殖を示さなかった（図4-1）。

第3節 胸腺 T 細胞亜群の Con A に対する応答性

未分画胸腺細胞，percoll 分画胸腺 T 細胞亜群の Con A に対する幼若化反応の違いについて検討した。その結果，IL 2 の応答性の場合と全く一致して，Fr 1 の胸腺細胞のみが Con A に対して高い応答性を示し，未分画胸腺細胞，Fr 2, Fr 3 の胸腺細胞群においては，Con A 幼若化反応は認められなかった（表4-1）。

Table 4-1. Different response of thymocyte subpopulations to Con A^a

Thymocytes	Con A	³ H-TdR incorporation (cpm) ^b
unfractionated	—	1972 ± 923
	+	2739 ± 363
Fr 1 cells	—	3367 ± 929
	+	154 730 ± 12 080
Fr 2 cells	—	2274 ± 354
	+	2923 ± 501
Fr 3 cells	—	1556 ± 299
	+	1305 ± 196

^a Thymocyte subpopulations fractionated by Percoll gradient were cultured at 2.5×10^4 cells/ml in the presence or absence of Con A (0.5 µg/well).

^b The cells were cultured for 32 h and then pulsed with ³H-TdR (0.5 µCi/well) for 4 h. Each datum represents the mean ± SE of triplicate samples.

第4節 胸腺 T 細胞亜群の IL 2 及び Con A に対する応答性の違い

前節まで，胸腺 T 細胞亜群の IL 2 及び Con A 単独の刺激に対する応答性を検討してきた。本節では，さらに，IL 2 と Con A の両者が存在した場合に，胸腺 T 細胞亜群がどのような応答性を示すかを検討した。

その結果，表4-2に示したように，Fr 1 の細胞は IL 2 単独，Con A 単独及び IL 2 と Con A 両者の刺激，いずれに対しても強い応答性を示した。しかし，Fr 2 の細胞は，IL 2，Con A 単独の刺激に対しては応答を示さず，IL 2 と Con A の両者が存在した場合に始めて強い分裂増殖を示すことが明らかとなった。Fr 3 の細胞は IL 2 と Con A 両者が存在した場合にも，全く応答性を示さなかった。この結果から，胸腺内には，IL 2 単独に反応する細胞，抗原の存在下で IL 2 に反応する細胞，及び，いずれの刺激に対しても応答性を示さない細胞の三つの細胞群が存在すると考えられる。

Table 4-2. Different response of thymocyte subpopulations to IL 2 and/or Con A^a

Thymocytes	Stimulator	³ H-TdR incorporation (cpm) ^b
Unfractionated	—	190 ± 1
	Con A	11 348 ± 82
	IL 2	822 ± 40
	IL 2 + Con A	40 571 ± 985
Fr 1 cells	—	574 ± 101
	Con A	81 458 ± 2420
	IL 2	112 883 ± 1199
	IL 2 + Con A	119 067 ± 6795
Fr 2 cells	—	178 ± 5
	Con A	3148 ± 464
	IL 2	2792 ± 213
	IL 2 + Con A	61 788 ± 370
Fr 3 cells	—	36 ± 1
	Con A	419 ± 16
	IL 2	45 ± 1
	IL 2 + Con A	3274 ± 93

^a Thymocyte subpopulations fractionated by Percoll gradients were cultured at 2.5×10^4 cells/ml in the presence or absence of IL 2 and/or Con A.

^b The cells were cultured for 32 h and then pulsed with ³H-TdR (0.5 μ Ci/well) for 4 h. Each datum represents the mean \pm SE of triplicate samples.

第 5 節 胸腺 T 細胞亜群の Thy 1.2 抗原密度の違い

胸腺細胞は、その分化段階の違いにより、Thy 1.2 抗原密度が異なっていることが知られている。そこで、Con A や IL 2 に対して異なった応答性を示した胸腺 T 細胞亜群の Thy 1.2 抗原密度の違いを補体依存性細胞傷害性試験を用いて検索した。各胸腺細胞亜群の Thy 1.2 抗原密度は、用

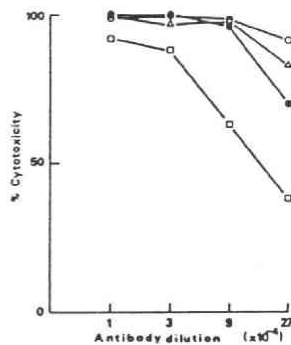


Fig. 4-2. Thy 1.2 antigen density of thymocyte subpopulations. The density in thymocyte subpopulations was examined by the trypan blue dye exclusion test. Δ , unfractionated; \square , Fr 1 cells; \bullet , Fr 2 cells; \diamond , Fr 3 cells.

いた抗 Thy 1.2 抗体の濃度が高い場合には有意な差はないが、抗 Thy 1.2 抗体の希釈に伴いその差は明らかとなり、Fr 3 > Fr 2 > Fr 1 の順に Thy 1.2 抗原密度は高いことが示唆された (図 4-2)。

第 6 節 胸腺 T 細胞亜群の細胞表面マーカー

Percoll 不連続密度勾配遠心法で分画した、胸腺 T 細胞亜群の性状をさらに明確にするために、間接蛍光抗体法を用いて各細胞群の表面マーカーを検索した。その結果、IL 2 単独に対して高い応答性を示した Fr 1 の細胞群では、未分画胸腺細胞に比べて、 $Ly 1^+ 2^-$ T 細胞の比率が高く、逆に、 PNA^+ T 細胞の割合は減少していた。また、Fr 2, Fr 3 の細胞は IL 2 と Con A 両者の刺激に対しては異なった応答性を示したが、細胞表面マーカー上では有意な差が認められず、未分画胸腺細胞と同様の比率で、 $Ly 1^+$, $Ly 2^+$, PNA^+ T 細胞が存在した (表 4-3)。

Table 4-3. Cell surface markers of thymocyte subpopulations^a

Markers	% positive cells ^b			
	Unfractionated	Fr 1 cells	Fr 2 cells	Fr 3 cells
Thy 1.2	97.0	99.0	98.5	97.0
Ly 1.2	11.0	68.5	18.5	10.0
Ly 2.2	89.5	30.5	85.5	87.5
PNA receptor	82.5	23.5	93.5	95.5

^a Cell surface markers of fractionated thymocytes were examined by using FITC-labeled monoclonal antibodies or PNA.

^b Two hundred to 500 cells were counted per slide. The figure represents the percentage of fluorescein positive cells.

第 7 節 胸腺 T 細胞亜群の DNA 合成能

胸腺細胞は末梢リンパ系臓器に導入される T 細胞の前駆細胞として、非常に早い速度で分裂をくり返していると思われる。従って、胸腺内の細胞群は無刺激の状態の高い DNA 合成 (Spontaneous incorporation of ³H-thymidine; SIT) を示す。しかし、胸腺内で分裂した細胞全てが末梢に導入されるとは考えずらく、殆んど胸腺細胞は胸腺内で死滅すると考えた方が妥当である。

もし、この考えが事実であれば、percoll 分画された胸腺 T 細胞亜群を in vitro で培養した場合、異なった速度でこれらの細胞が死滅することが予想される。そこで、未分画胸腺細胞、Fr 1, Fr 2, Fr 3 の細胞群の 0 及び 12 時間培養後の DNA 合成能を ³H-thymidine を用いて検討した。その結果、IL 2, Con A いずれにも応答性を示さなかった Fr 3 の細胞群の DNA 合成能は、他の細胞群に比べ、培養開始 12 時間後に著しく減少することが明らかとなった (表 4-4)。

Table 4-4. Spontaneous incorporation of ³H-TdR (SIT) in thymocytes subpopulations^a

Thymocytes	³ H-TdR incorporation (cpm) ^b		% Reduction
	0 h	12 h	
Unfractionated	45 007 ± 2059	26 462 ± 1600	41.2
Fr 1 cells	38 367 ± 2991	22 900 ± 2171	40.3
Fr 2 cells	51 873 ± 3090	46 917 ± 890	9.6
Fr 3 cells	25 806 ± 1363	4351 ± 369	83.1

^a SIT was measured by pulsing thymocyte subpopulations (2.5×10^4 cells/ml) with ³H-TdR (0.5 μ ci/well) at initial of culture or 12 h after culture.

^b ³H-TdR incorporation was measured at 0-4 h or 12-16 h. The data represent the mean ± SE of triplicate samples.

第 8 節 考 察

胸腺細胞中には、IL 2 や Con A に対する応答性の違い、細胞表面マーカーの違い、さらに SIT の減少度の違いから判断して、三つの異なる T 細胞亜群が存在すると考えられる。

Fr 1 細胞は Ly 1⁺, PNA⁻ 細胞の割合が多く、従来報告されている胸腺髄質細胞であると思

われ、⁴⁹⁻⁵²⁾ この細胞群は、IL 2, Con A いずれの刺激に対しても末梢リンパ球と同様に反応した。Fr 2, Fr 3の細胞群は、細胞表面マーカーの点から判断すれば有意な差意は認められない。しかし、Fr 2の細胞群はIL 2とCon Aが共存した場合にのみ強い応答性を示したのに対し、Fr 3の細胞群は、いずれの刺激に対しても応答性を示さなかった。従って、 $Ly1^{-}, 2^{+}, PNA^{+}$ の胸腺皮質細胞群には、IL 2とCon Aに対する応答性から判断して、二つの異なる細胞群が存在すると思われる。

PNA^{+} 胸腺細胞からのkiller T細胞誘導に関して、二つの矛盾する報告がなされたのも、 PNA^{+} 胸腺細胞中にIL 2 応答性の異なる二つの細胞群が存在していることに起因すると思われる。すなわち、killer T細胞誘導の際に多数の PNA^{+} 細胞を用いた場合には、その中に含まれるFr 2に相当する細胞の絶対数がふえ、IL 2の存在下で抗原によく反応し、killer T細胞が誘導され、逆に用いる PNA^{+} 細胞数が少ない場合には、含まれる応答性細胞数が少ないためkiller T細胞の誘導は困難であると思われる。

従来、T細胞の分化はCon A等に対する応答性によって区分されており、この基準に従えば、 $Fr 1 > Fr 2 > Fr 3$ の順に分化段階の進んだ細胞群であると言える。しかし、このような方法でT細胞の分化を考える場合、一つの大きな矛盾が生ずる。それは、T細胞前駆細胞は胸腺に入る前には殆んどThy 1, 2 抗原を有していないのに、胸腺内に移行したとたんに、胸腺中では最も高いThy 1, 2 抗原密度を有したT細胞に変換するということである。細胞の分化はもっと自然に行なわれるものであり、ジグザグな形での分化はありえないように思われる。Fr 3の細胞は、全ての抗原に反応しえないから、すなわち骨髓から移行したばかりの未成熟な胸腺細胞であると考えるのは不自然であるように思われ、Thy 1, 2 抗原密度、SITの実験から判断して、Fr 3の細胞は胸腺内で過剰生産され、胸腺内で死滅して行く細胞群であると考えた方が妥当であると思われる。

胸腺におけるT細胞分化のメカニズムは未だに明らかにされてないが、筆者は、Macpheeらが報告したように、⁵³⁾ 殆んど胸腺細胞は胸腺内で死滅し、その後に生き残ったFr 1, Fr 2に相当する細胞群が、胸腺内寧は末梢リンパ系臓器に移行した後に、抗原とIL 2の刺激をうけ、そのクローンを拡大するものと考えている。

第 5 章 Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の誘導と性状

第 1 節 序 論

細胞融合技術の導入, interleukin 2 (IL 2) を用いた T 細胞の長期培養など, いわゆるバイオテクノロジーの進展に伴い, 癌の免疫療法も近年急激な発展を遂げるに至った。現在注目を集めている癌の免疫療法には, モノクローナル抗体と制癌剤の結合体を用いたミサイル療法や,¹⁰⁾ 抗腫瘍活性を有したリンパ球の移入による adoptive immunotherapy (A I T) 等がある。¹¹⁾

A I T は理想的には自己腫瘍に対して特異的に作用する killer T 細胞, あるいは killer T 細胞誘導を補助する helper T 細胞の移入によって行なわれるべきである。しかし, 担癌動物において, これら獲得免疫機構が作動し, 自己腫瘍に対して抵抗性を発現する場合は稀であり, むしろ抑制性細胞や因子により免疫能は低下した状態にある。⁵⁴⁻⁵⁶⁾ そこで最近では, 生体にもともと備わった自然抵抗性の担い手である Mφ や NK の活性化によって免疫賦活を試みようとする動きがでてきた。しかし, Mφ や NK 細胞の抗腫瘍活性はさほど強くはなく, またこれらの細胞を A I T に用いるだけ集めることは容易なことではない。

しかし, 近年, Rosenberg らにより IL 2 で癌患者末梢血リンパ球を刺激することにより, 自己固型腫瘍を含む各種癌細胞に対して強い cytotoxicity を示す L A K 細胞が誘導されることが報告され, in vitro で強い抗腫瘍活性を有する L A K 細胞を大量に誘導することも可能となった。^{24, 60-63)} 自己の正常細胞には作用を示さず, 癌ならなんでも殺す, この L A K 細胞は今後何らかの形で癌の免疫療法に役立ちうるものと考ええる。

本章では, マウス, ヒト L A K 細胞の種々のリンパ球からの誘導について述べ, さらに, マウス, ヒト L A K 細胞の性状についても論述する。

第 2 節 マウス脾細胞からの L A K 細胞の誘導

C57BL/6 マウス脾細胞をラット IL 2 の存在下で 37℃, 4 日間培養することにより, 濃度依存的に細胞の分裂増殖が認められ, これらの IL 2 で活性化された細胞群 (L A K 細胞) は同系腫瘍 BMC 2 に対して強い cytotoxicity を示した。また, mitomycin C (MMC) 処理した BMC 2 の存在下で脾細胞を IL 2 で刺激した場合には, 細胞の DNA 合成は若干抑制されたが BMC 2 に対して cytotoxicity を示す killer 細胞の誘導は有意に増強されることが判明した (図 5-1 A, B)

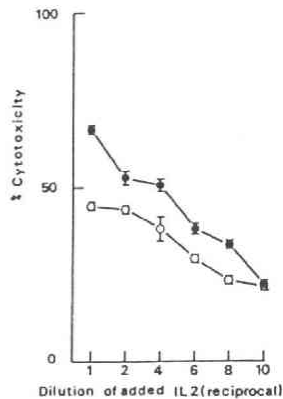


Fig. 5-1A. IL-2 dose and generation of killer cells with or without stimulation of MMC-BMC2 tumor cells

Spleen cells ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured with or without MMC-BMC2 cells ($5 \times 10^4/\text{ml}$) in the presence of IL-2 for 4 days. Cytotoxic activity against BMC2 cells (effector/target cell ratio=100:1) was measured by the ^3H -uridine method. O, without MMC-BMC2 cells; ●, with MMC-BMC2 cells. In the absence of IL-2, cytotoxicities of the cells from cultures of spleen cells alone and of spleen cells plus MMC-BMC2 cells were 1.3 and 2.2%, respectively, as judged from the radioactivity of the culture of tumor cells alone.

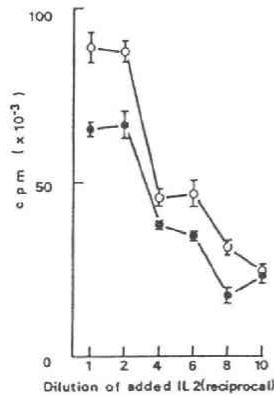


Fig. 5-1B. IL-2 dose and proliferation of spleen cells

Spleen cells ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured with or without MMC-BMC2 cells ($5 \times 10^4/\text{ml}$) in the presence of IL-2. After a 4-day culture, aliquots (100 μl) of each cell suspension were transferred into 96-well plastic plates and then pulsed with 0.5 μCi of ^3H -TdR for 4 hr. O, without MMC-BMC2 cells; ●, with MMC-BMC2 cells. In the absence of IL-2, the ^3H -TdR incorporations in cultures of spleen cells alone and spleen cells plus MMC-BMC2 cells were 2300 ± 158 and 4150 ± 380 cpm, respectively.

第3節 LAK細胞誘導のkinetics

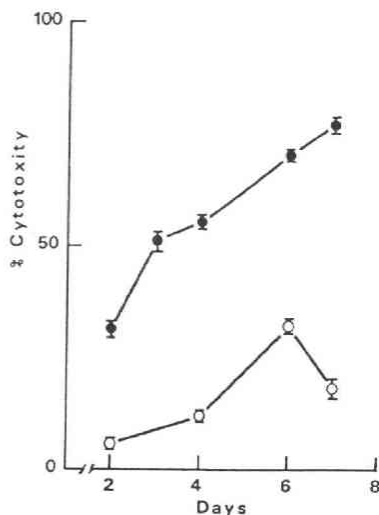


Fig. 5-2. Kinetics of the generation of IL-2-induced killer cells

Spleen cells ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) were co-cultured with MMC-BMC2 cells ($5 \times 10^4/\text{ml}$) in the presence or absence of IL-2. Cytotoxic activity of the spleen cells was measured as described in Fig. 1. O, absence of IL-2; ●, presence of IL-2.

C57BL/6 マウス脾細胞をMMC処理したBMC2の存在下で6日間培養し, mixed lymphocyte-tumor reaction (MLTR) を行った場合, 培養開始6日後においてBMC2に対してcytotoxicityを示すkiller細胞の出現が認められたが, その活性はさほど強いものではなかった。これに対して, IL2の存在下でMLTRを行った場合には, 培養開始2日目において既にkiller細胞の出現が認められ, 以後経時的にその活性は増強された(図5-2)。

第4節 Killer誘導因子とIL 2の異同

IL 2画分には、もちろんT細胞の分裂増殖を促進する因子が含まれているが、その他にCSF⁴⁴⁾やIL 3^{64, 65)}等が混在している可能性もある。従って、IL 2画分の添加によって誘導されたkiller細胞は、IL 2の刺激によってではなく、他の因子の影響で誘導された可能性もある。そこで、IL 2画分のkiller誘導活性とT細胞増殖活性を比較検討し、killer誘導がIL 2によるものか否かを検討した。

IL 2依存性T細胞クローンT572を用いて、ゲルろ過で精製した各画分のIL 2活性を測定した。その結果、IL 2活性は分子量約22,000~26,000の画分に分離された。また、同画分を用いてkiller細胞の誘導を検索した結果、IL 2活性を示す画分に、強いkiller細胞誘導能が認められた(図5-3)。この結果より、T細胞増殖促進作用を有するIL 2、そのものの刺激によって、killer細胞が誘導されるものと考えられる。

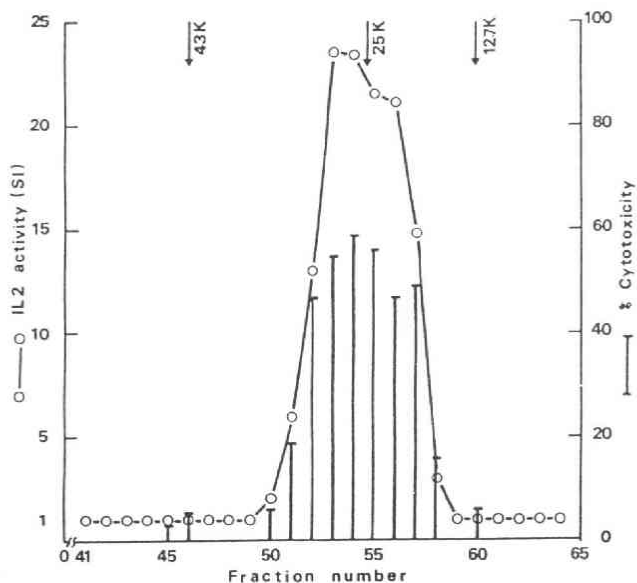


Fig. 5-3. Elution profile of factors stimulating T cell proliferation and inducing killer cells
IL-2 fraction obtained by ammonium sulfate precipitation was fractionated on a Sephacryl S-200 column. The fractions containing IL-2 activity were re-chromatographed with a Sephacryl S-200 column and then each fraction was assayed for activity to proliferate T572 cells and to induce killer cells. Ovalbumin (mol. wt. 43K), chymotrypsinogen A (mol. wt. 25K) and cytochrome c (mol. wt. 12.7K) were used as standard marker proteins for molecular weight.

第5節 LAK細胞の抗原特異性

マウス脾細胞をIL 2とMMC処理BMC 2の存在下で5日間培養し、LAK細胞を誘導し、その抗原特異性について検討した。

従来報告されてきたkiller T細胞は、誘導の際に用いた抗原に対して特異的に作用すること

Table 5-1. Antigenic Specificity of IL-2-induced Killer Cells

Target cells	% Cytotoxicity ^{a)}	
	Untreated	anti-Thy 1.2+C
BMC2	43.4±1.0	10.0±4.8
BMC4	18.8±0.9	11.0±0.9
BMC6A	37.4±1.0	9.0±0.2
BMC8	14.6±6.8	0±0.2
YAC-1	16.4±9.1	5.3±0.4
RADA1	0±1.2	0±5.5
P815	16.2±0.8	0±1.0
BW5147	57.2±0.2	29.6±1.4
MethA	0.7±1.8	0±0.3

a) Effector/target cell ratio: 50:1. Mean±SD of triplicate samples.

C=complement.

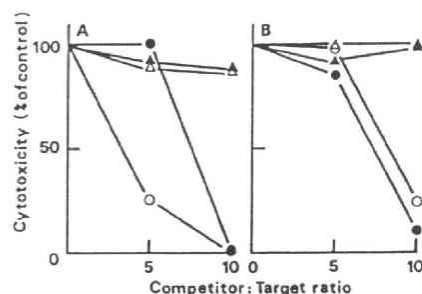


Fig. 5-4. Cold target inhibition test for IL-2-induced killer cells

Cytotoxicity of spleen cells (5×10^6 /ml) treated with IL-2 alone (A) or IL-2 plus MMC-BMC2 (B) were assayed in the presence of isotope-unlabeled competitor tumor cells by using ^3H -uridine-labeled BMC2 cells as a target. O, BW5147; ●, BMC2; ▲, YAC-1; △, RL81.

が知られているが、表5-1に示したように、LAK細胞はkiller T細胞とは異なり、同系腫瘍BMC2, BMC4, BMC6A, BMC8のみならず、同種癌細胞であるYAC-1, P815, BW5147に対しても強い cytotoxicityを示した。また、その活性は、LAK細胞を抗Thy 1.2抗体と補体で処理することにより著しく低下した。

次に、LAK細胞の各種癌細胞に対する cytotoxicityが同一のkiller細胞によって発現しているか否かについて、 ^3H -uridineで非標識の targetを用いた、いわゆる cold target inhibitionテストを用いて検討した。その結果、LAK細胞の BMC2に対する cytotoxicityは BW5147の添加によって強く阻害されるが、NK細胞の targetとして知られているYAC-1やRL81の添加によっては阻害をうけなかった(図5-4)。

第6節 LAK細胞の性状

各種の癌細胞に対して cytotoxicityを示すLAK細胞がどのような細胞表面マーカーを有した細胞であるかを種々の抗体と補体を用いて検索した。その結果、BMC2, YAC-1, BW5147に対する cytotoxic 活性は、エフェクター細胞を抗Thy 1.2抗体と補体で処理することによって著しく減少した。しかし、NK細胞に反応性を有する抗asialo GM₁抗体と補体の処理によっては、YAC-1細胞に対する cytotoxicityは殆んど完全に消失したが、BMC2や

BW5147 に対する cytotoxicity は強い影響はうけなかった (図 5-5)。

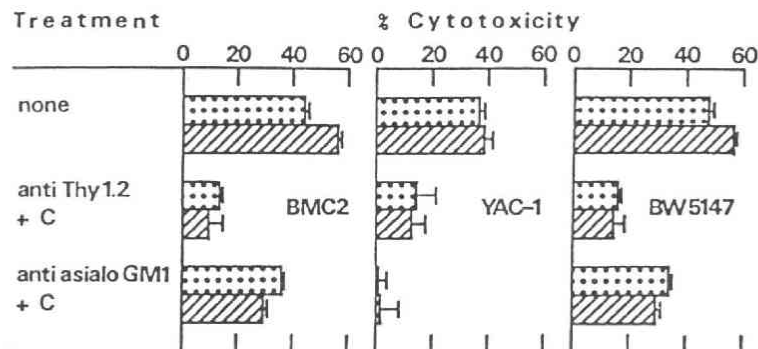


Fig. 5-5.

Surface markers of IL-2-induced killer cells

Killer cells induced from spleen cells by stimulation with IL-2 alone or IL-2 plus BMC2 were treated with anti-Thy 1.2 antibody plus complement or anti-asialoGM₁ plus complement, and the cytotoxic activities against BMC2, YAC1 and BW5147 cells were assayed by the ³H-uridine method. Effector/target cell ratio=50:1. [Dotted], IL-2 alone; [Hatched], IL-2 plus BMC 2.

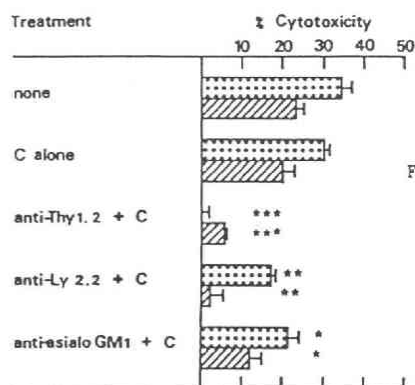


Fig. 5-6. Characterization of cell surface markers of IL-2-induced killer cells

Killer cells induced from spleen cells by stimulation with IL-2 plus MMC-BMC2 were treated with anti-Thy 1.2, anti-Ly 2.2 or anti-asialoGM₁ plus complement, and the cytotoxic activity against BMC2 was assayed by the ³H-uridine method. Effector/target cell ratio: [Dotted], 50:1; [Hatched], 25:1. Statistical significance of differences as determined by Student's *t* test: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

さらに、図 5-6 に示したように、BMC2 に対する killer 細胞の cytotoxicity は抗 Ly2, 2 抗体と補体処理によっても消失した。これらの結果から、IL 2 によって活性化誘導された killer 細胞群の中には、Thy 1.2⁺, Ly 2⁺, asialo GM₁⁻ の BMC2, BW5147 に対して強い cytotoxicity を示す killer 細胞と、Thy 1.2⁺, Ly 2⁻, asialo GM₁⁺ の YAC-1 に対して

Table 5-2. Nylon Wool Column Treatment of IL-2-induced Killer Cells Stimulated with BMC2

Effector	E:T	Retained radioactivity ^{a)} Target cells		
		BMC2	BW5147	RLS ¹
—		1291.0 ± 67	4850.0 ± 117	6628.5 ± 250
Nontreated	100:1	720.0 ± 56 (44.2)	2543.0 ± 66 (47.5)	4371.0 ± 195 (34.0)
	50:1	903.0 ± 40 (30.0)	3111.0 ± 85 (35.8)	4871.0 ± 139 (26.6)
Nylon wool passed	100:1	736.0 ± 27 (42.9)	2950.0 ± 102 (39.1)	5246.5 ± 48 (20.0)
	50:1	1041.5 ± 52 (19.3)	3683.0 ± 75 (24.0)	5515.0 ± 164 (16.8)

a) Mean cpm ± SD of triplicate samples. Data in parenthesis represent % cytotoxicity.

cytotoxicity を示すNK細胞が存在すると思われる。また、LAK細胞はナイロンウールカラムを通過しても、その cytotoxicity を消失しないことより、ナイロン非付着性のT細胞であることが確認された(表5-2)。

第7節 LAK細胞誘導におけるMφの関与

一般に、killer T 細胞誘導においては、Mφが必要であると言われている。そこで、マウス脾細胞から、glass wool, nylon wool, carbonyl iron を用いてMφを除いたT細胞画分を得、このT細胞群からのLAKの誘導を試みた。その結果、Mφを除去したT細胞画分から、IL 2 単独、及び、IL 2 と抗原の刺激によって、未分画脾細胞からと同様に、強い活性を有したLAK細胞が誘導された(表5-3)。

Table 5-3. Generation of IL-2-induced Killer Cells from Enriched T Cell Population

Responder ^{a)}	Stimulator	IL-2 added ^{b)}	Retained radioactivity ^{c)} (cpm)
Unfractionated spleen cells	—	—	1026.0±120 (1.3)
	—	+	781.5±48 (24.8)
	BMC2	—	1077.5±1 (-3.6)
	BMC2	+	586.0±4 (43.6)
Fractionated spleen cells	—	—	1119.0±32 (-7.2)
	—	+	851.0±28 (18.5)
	BMC2	—	998.0±50 (4.0)
	BMC2	+	655.5±20 (37.0)

a) Enriched T cell population was obtained from spleen cells by fractionation with glass wool, nylon wool and carbonyl iron treatment.

b) IL-2 was added to the culture at 45 U/0.1 ml.

c) Mean cpm±SD of triplicate samples. Data in parenthesis represent % cytotoxicity.

第8節 LAK細胞誘導におけるIFN- γ の関与

マウス脾細胞を IL 2 と MMC を用いて刺激し、LAK細胞を誘導する際の培養上清中のIFN

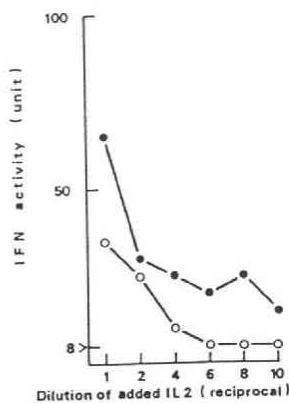


Fig. 5-7. IL-2 dose and production of IFN. Spleen cells (2.5×10^6 /ml) were co-cultured with or without MMC-BMC2 cells (5×10^6 /ml) in the presence of IL-2 for 4 days at 37°, and then the IFN activity in culture supernatant was assayed. O, without MMC-BMC2 cells; ●, with MMC-BMC2 cells. IFN in the supernatants in cultures of both spleen cells alone and spleen cells plus MMC-BMC2 was less than 8 units.

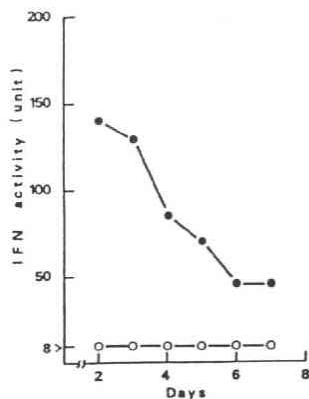


Fig. 5-8. Kinetics of IFN production. Spleen cells (2.5×10^6 /ml) were co-cultured with MMC-BMC2 (5×10^6 /ml) in the presence or absence of IL-2, and the IFN activity in culture supernatants was assayed. O, without IL-2; ●, with IL-2.

活性を測定し、LAK細胞産生におけるIFNの役割について検討した。マウス脾細胞をIL 2の非存在下でMMC処理BMC 2で刺激した場合には全くIFNの産生は認められなかったが、IL 2の存在下で刺激した場合には、培養2日後に高いIFNの産生が認められ、以後経時的に、その活性は減少することが認められた(図5-7)。また、図5-8より、IL 2単独の刺激によってもIFNの誘導が引き起こされ、IL 2単独の刺激よりも、IL 2と抗原の刺激によって、より強いIFNの誘導が起こることが明らかとなった。この系で産生されるIFNはpH 2処理によってその活性を失うことから、IFN- γ であると思われ、IFN- γ はLAK細胞産生の初期に重要な役割を担っていると思われる。

第9節 マウス腫瘍内浸潤リンパ球からのLAK細胞の誘導

メチルコラントレン誘発C57BL/6マウス肉腫BMC 2、 10^7 個を移植15日後の腫瘍塊から、ガラスウールを用いて腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)を集め、TILからのLAK細胞の誘導を検討した。TIL中には約20%の腫瘍が混在しており、IL 2の非存在下で培養した場合には腫瘍の優先的な増殖が認められ、リンパ球は消失した。これに対して、IL 2の存在下でTILを培養した場合には腫瘍は死滅し、大型のリンパ球の分裂増殖が認められた(図5-9)。

IL 2の刺激により、TILから分裂増殖した細胞のcytotoxicityを調べた結果、脾細胞から誘導したLAK細胞と同様に各種の癌細胞に対して強いcytotoxicityを示した(表5-4)。

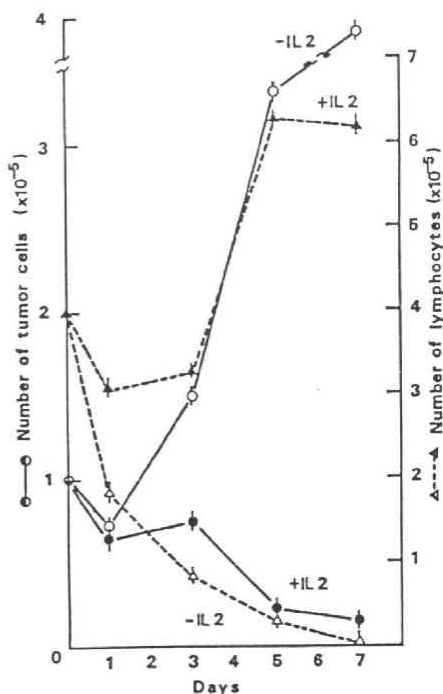


Fig. 5-9. Predominant growth of lymphocytes from TIL by culture with IL 2.

Table 5-4. TARGET SPECIFICITY OF LAK CELLS GENERATED FROM LRFT

Target cells	% Cytotoxicity ^a
BMC 2 (H-2 ^b)	72.4 ± 0.6
BMC4 (H-2 ^b)	46.0 ± 1.9
BMC6A (H-2 ^b)	64.2 ± 5.3
BMC7 (H-2 ^b)	37.4 ± 0.9
BMC8 (H-2 ^b)	39.0 ± 5.5
E14 (H-2 ^b)	0 ± 9.3
B16 (H-2 ^b)	51.1 ± 2.8
RADA1 (H-2 ^a)	20.2 ± 3.9
YAC-1 (H-2 ^a)	0 ± 1.2
MethA (H-2 ^d)	0.9 ± 2.5
RLol (H-2 ^d)	0 ± 0.7
BW5147 (H-2 ^k)	38.1 ± 2.4
MM46 (H-2 ^k)	18.9 ± 8.9

^a Cytotoxicity of LAK cells was measured by ³H-uridine method. Effector to target ratio was 50 : 1. The figure represents mean ± SD of triplicate samples.

T I Lから誘導されるL A K細胞は約60%が, Thy 1.2⁺, Ly 2⁺ の細胞群からなり, これらの細胞がL A K活性を有していると思われるが, 抗体と補体処理に対して耐性のため, Thy 1.2⁺, Ly 2⁺の細胞であるとは断言できない(表 5-5)。

Winn テストを用いて, T I Lから誘導されるL A K細胞(T-L A K)の in vivo 効果を検索した結果, 図 5-10に示すように, T-L A Kは in vivo においても強い抗腫瘍活性を示すことが証明された。

また, このようなT I LからのL A K細胞の誘導は, 移植継代されているB M C 2のみならず,

Table 5-5. SURFACE MARKERS OF LAK CELLS GENERATED FROM LRFT

Antigen	% Positive ^a
Thy 1.2	97
Ly 1.2	2
Ly 2.2	59

^a About 500 cells were counted under a fluorescence microscope and % positive cells was calculated.

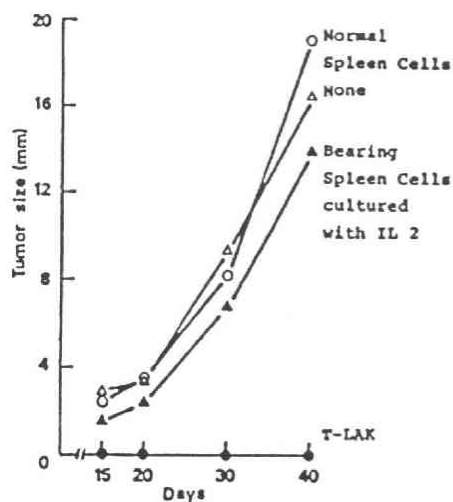


Fig. 5-10. In vivo anti-tumor activity of T-LAK.

Table 5-6. GENERATION OF LAK CELLS FROM LYMPHOID CELLS INFILTRATED INTO THE AUTOCHTHONOUS SOLID TUMOR

E/T ratio	% Cytotoxicity against ^a	
	B4C11 ^b	B4C2
<u>Exp. 1</u>		
30 : 1	50.7 ± 0.3	68.7 ± 1.3
15 : 1	31.4 ± 2.0	29.0 ± 3.0
<u>Exp. 2</u>		
	B4C12	B4C2
30 : 1	53.3 ± 1.2	65.8 ± 0.7
15 : 1	36.2 ± 0.6	24.7 ± 1.7

^a Cytotoxicity was measured by ³H-uridine method. The figure represents mean ± SD of triplicate samples
^b Autochthonous solid tumor, B4C11 and B4C12 were obtained from the tumors induced in C57BL/6 mice by injection of 3-methylchoranthrene.

メチルコラントレンで誘発した原発の癌 (B M C 11, 12) に浸潤したT I Lからも認められ, B M C 11, B M C 12のT I Lから誘導したL A K細胞は自己腫瘍, B M C 2のいずれに対しても強い cytotoxicityを示した(表 5-6)。

第10節 ヒト胃癌内浸潤リンパ球からのLAK細胞の誘導

ヒト胃癌組織を機械的に破碎，又は酵素処理することによって，腫瘍内浸潤リンパ球を得，IL 2 の存在下で培養した。マウスの場合とは異なり，IL 2 の非存在下における胃癌の増殖は認められなかったが，IL 2 の存在下では，大型リンパ球の分裂増殖が認められた。この細胞群の各種癌細胞，正常細胞に対する cytotoxicity を検索した結果，マウス系の場合と同様に幅広い target specificity を示す LAK 細胞が誘導されていることが明らかとなった（表 5-7）。しかし，ヒト TIL から誘導した LAK 細胞は自己の正常細胞である fibroblast や PHA blast に対しては cytotoxicity を示さなかった。癌患者末梢血から得られた PBL-LAK の活性も同時に検討した結果，PBL-LAK も各種の癌細胞に対して cytotoxicity を示し，自己正常細胞には cytotoxicity を示さなかった。

次にヒト T 細胞亜群に対するモノクローナル抗体と補体を用いて，TIL から誘導された LAK 細胞の表面マーカーを調べた。その結果，T-LAK 活性は，OKT 3 及び OKT 8 と補体処理で減少することより，killer T 細胞と同様の表面マーカーを有する細胞であると思われる（表 5-8）。

Table 5-7. Generation of LAK from PBL and TIL obtained from Gastric Cancer Patients

Target cells	% Cytotoxicity ^a		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
<u>PBL-LAK</u>			
Gas 1	32.7 ± 4.7	19.6 ± 5.5	12.9 ± 0.9
Marcus	42.1 ± 3.5	27.0 ± 4.0	ND
MCF 7	15.6 ± 2.1	24.0 ± 5.2	13.1 ± 1.0
Luci 3	ND	ND	14.0 ± 0.8
Daudi	18.3 ± 0.6	71.0 ± 2.7	76.7 ± 1.0
P3HR1	ND	ND	57.0 ± 4.4
Molt-4F	0	0	0
Jurkat	0	ND	ND
Fibroblasts	0.7 ± 3.2	ND	0.7 ± 1.2
PHA blasts	0	0	7.2 ± 3.2
<u>T-LAK</u>			
Gas 1	29.7 ± 4.1	24.0 ± 5.5	0
Marcus	43.6 ± 4.6	18.5 ± 5.1	ND
MCF 7	13.5 ± 2.7	16.5 ± 4.9	ND
Luci 3	ND	ND	0.6 ± 5.5
Daudi	33.2 ± 5.0	33.1 ± 5.0	28.7 ± 4.8
P3HR1	ND	ND	14.1 ± 5.3
Molt-4F	0	0	0
Jurkat	0	ND	ND
Fibroblasts	0	ND	ND
PHA blasts	0	0	5.3 ± 7.4

^a Effector/target cell ratio ; 20:1. The figures represents mean ± SD of triplicated samples.

Table 5-8. Characterization of LAK generated from PBL and TIL by Culture with IL 2

Aggressor Cells treated with	% Cells killed	% Cytotoxicity ^a
<u>PBL-LAK</u>		
None	-	67.3 ± 0.1
Leu 1 + C ^b	97.3	22.3 ± 3.9
L-2 + C	56.8	22.0 ± 5.0
Leu 7 + C	41.5	37.2 ± 7.6
C alone	8.9	65.8 ± 1.7
<u>T-LAK</u>		
None	-	29.4 ± 2.0
OKT3 + C	84.8	9.6 ± 0.7
OKT4 + C	31.8	21.0 ± 2.3
OKT8 + C	42.4	4.6 ± 0.6
C alone	0	23.7 ± 1.9

^a The figures represents mean ± SD of triplicated samples. Effector/target cell ratio ; 20 : 1.

^b C = Complement

また、PBL-LAKの細胞表面マーカーについても検討した結果、PBL-LAKはLeu1抗体(OKT3に相当)と補体、L-2抗体(OKT8に相当)と補体処理によってその活性を消失した。また、NK細胞に対する抗体であるLeu7と補体で処理した場合にも、cytotoxicityが減弱したことより、PBL-LAK中にはNK細胞も混在しているものと思われる。

第11節 考 察

ゲルろ過法により精製したラットIL2及び遺伝子組み換え操作によって作製したrecombinant ヒトIL2を用いて、T細胞増殖促進活性を有したIL2そのものが、LAK細胞誘導能を有していることが明らかとなった。

通常のMLTRによるkiller T細胞の誘導は培養6日目に認められるが、同系腫瘍に対するkiller活性はさほど強いものではない。これに対し、IL2によって誘導されるLAK細胞は、反応2日目に出現し、4日目には、各種の同系腫瘍及び同種腫瘍に対して強いcytotoxicityを示した。

Cold target inhibition テストの結果から、IL2により活性化誘導されるkiller細胞群には、YAC-1細胞に対して強いcytotoxicityを示すNK細胞と、BMC2、BW5147等に強い活性を示すLAK細胞が存在すると考えられる。また、LAK細胞のBMC2に対するcytotoxicityはBW5147の添加によって阻害をうけることより、LAK細胞の各種の癌細胞に対するcytotoxicityはmonoclonalなLAK細胞によって発現されていると思われる。

IL2で活性化された脾細胞群に二つの異なるエフェクター細胞が存在することは、抗体と補体処理の実験からも明らかにされ、IL2活性化killer細胞群には Thy 1.2^+ , Ly 2^+ , asialo GM_1^- のLAK細胞と Thy 1.2^+ , Ly 2^- , asialo GM_1^+ のNK細胞が存在することが証明された。⁶⁶⁾

LAK細胞誘導においては、killer T細胞誘導の場合とは異なり、Mφの関与は必要でないと思われる。^{67, 68)}しかし、IFNはkiller T細胞誘導の場合と同様に、LAK細胞の産生初期に重要な役割を担っていると考えられる。⁶⁹⁾事実、伊藤ら⁷⁰⁾は、最近、LAK細胞誘導においてIFN- γ が不可欠であることを、抗IFN- γ 抗体を用いて証明している。

LAK細胞は脾細胞からのみではなく、腫瘍内に浸潤したTILからも誘導可能であった。マウスTILから誘導したLAK細胞は大型でアズール顆粒を有したlarge granula lymphocyte (LGL)であり、主に Thy 1.2^+ , Ly 2^+ の細胞群から成っていた。⁷¹⁾また、ヒト胃癌のTILから誘導したLAKもT細胞マーカー(OKT3, OKT8)を有し、各種の癌細胞に対してcytotoxicityを示すことが明らかとなった。

マウス系の場合、BMC2のTILから誘導したLAK細胞は、脾細胞から誘導したLAK細胞よりもBMC2に対して強いcytotoxicityを示し、腫瘍内には、その抗原に強い反応性を示

す特異的なkiller T細胞が存在することも考えられる。しかし、ヒト胃癌の場合には、PBLから誘導されるLAK細胞の方がTILから誘導されるLAK細胞よりも強い活性を示した。この原因としては、本実験に用いた癌が殆んどstage IVの末期癌であったことも考えられ、今後、さらに初期癌のTILからのLAK細胞誘導の検討が必要であると思われる。

LAK細胞は自己正常細胞に対してはcytotoxicityを示さず、*in vivo*においても抗腫瘍活性を示すことから、今後、外科手術、X線照射等の治療と組み合わせて、PBL又はTILから誘導したLAK細胞をadoptive transferすることによって、ある程度の癌治療が可能になるかもしれない。

第 6 章 LAK 細胞活性発現に必要な lymphokine-activated cell-associated (LAA) 抗原の解析

第 1 節 序 論

抗腫瘍エフェクター細胞としては現在, killer T 細胞, NK細胞, 活性化M ϕ およびLAK細胞等が上げられるが, これらのkiller 細胞がどのような機構で癌細胞を認識し, 破壊するかについては未だ明らかにされていない。

killer T 細胞の癌細胞破壊機構については, 橋本, Goldstein, Henneyらによって研究が行なわれており, killer T 細胞はbinding, lethal hit, cell destructionの三つの段階からなるサイクルによって, 次々と癌細胞を破壊することが知られている。⁷²⁻⁷⁶⁾ また最近ではLFA-1分子がkiller T 細胞の活性発現に重要であることや,⁷⁷⁻⁷⁹⁾ 細胞内顆粒によって最終的に癌細胞破壊がおこるのではないかとということが報告されている。^{80,81)}

しかし, killer T 細胞以外の幅広いtarget specificityを示す, NK細胞, 活性化M ϕ , LAK細胞等のいわゆる, broad-reactive killer (BRK) 細胞の癌細胞破壊機構については未だ明確にされていない。

筆者は, この問題を解決するために, マウスLAK細胞に強く反応し, かつLAK活性を阻害しうるモノクローナル抗体を作製し, この抗体を用いてLAK細胞, NK細胞等のBRK細胞の活性発現機構について解析を行った。^{82,83)}

第 2 節 LAK 細胞に対するモノクローナル抗体の作製

マウス脾細胞を200 U/mlのrecombinant IL 2 (γ -IL 2)の存在下, 5日間培養して誘導したLAK細胞は図6-1に示したように各癌細胞に対して強いcytotoxicityを示した。このLAK細胞(2×10^7 個)で二回免疫し, さらに 4×10^7 個のLAK細胞で, i.v., s.c., の最終免疫を行ったSDラット脾細胞とマウスミエローマP3 \times 63Ag8 \cdot 653とを細胞融合しhybridomaを作製した。Hybridoma 培養上清中の抗体のスクリーニングはLAK細胞のMBL-2に対するcytotoxicityの阻害活性によって行い, hybridomaの増殖が認められた1500well中17wellにおいて, LAK活性阻害能を有する抗体が産生されていた。そこで, さらに, これらの細胞をクローニングすることによって, KBA4, KBA6のモノクローナル抗体を産生する二つのhybridomaを得ることができた。

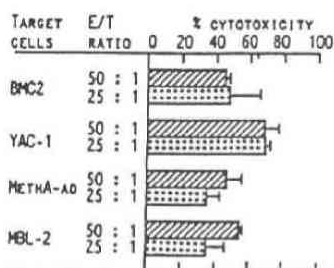


Fig. 6-1. Generation of LAK cells from mouse spleen cells by culture with recombinant human interleukin 2 (r-IL-2). C57BL/6 mouse spleen cells (5×10^6) were cultured in the presence of r-IL-2 (200 U/ml) for 5 days at 37°C . The cytotoxic activity of LAK cells was measured by the ^3H -uridine method.

第3節 モノクローナル抗体によるLAK活性の阻害

モノクローナル抗体, KBA 4, KBA 6 のLAK 活性に対する影響を検討した。その結果, KBA 4, KBA 6 いずれの抗体も, 濃度依存的にLAK 活性を阻害できた(図6-2)。

また, KBA 抗体のLAK 活性阻害能は, 4時間の cytotoxicity assay を行う前に, LAK 細胞をKBA 抗体で前処理することによっても確認できた(表6-1)。しかし, 8時間及び, 18時間の cytotoxicity assay においてはKBA 抗体前処理による阻害効果は認められなかった。これはLAK 細胞表面に結合したKBA 抗体が数時間で internalization されるためであると思われる。

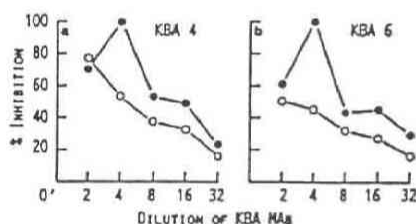


Fig. 6-2. Blocking effect of KBA MAb on cytotoxic activity of LAK cells. LAK cells were cocultured for 18 hr at 37°C with ^3H -uridine-labeled MBL-2 lymphoma cells in the presence or absence of either serial diluted KBA4 (a) or KBA6 (b). Effector-to-target cell ratios were 50:1 (○) and 25:1 (●), respectively.

TABLE 6-1.
Inhibition of LAK Cell-Mediated Cytotoxicity by Pretreatment of LAK Cells with KBA MAb

Incubation period (hr)	KBA MAb treatment	Cytotoxicity* (%)	Inhibition (%)
4	—	20.6 ± 4.4	
	Pretreatment ^b	9.9 ± 3.7	52.1
	Simultaneous treatment ^c	ND	ND
8	—	26.1 ± 3.3	
	Pretreatment	25.4 ± 7.0	2.6
	Simultaneous treatment	5.0 ± 7.5	80.7
18	—	39.1 ± 4.9	
	Pretreatment	33.1 ± 1.2	15.5
	Simultaneous treatment	3.6 ± 9.6	90.7

* LAK cells were cocultured with ^3H -uridine-labeled MBL-2 lymphoma cells for various incubation periods and their cytotoxicity was measured by the method described under Materials and Methods. Effector-to-target cell ratio was 25:1. The data are means \pm SD of triplicate samples.

^b LAK cells were preincubated for 1 hr at 4°C with KBA MAb.

^c The LAK cell-mediated cytotoxicity was measured in the presence of KBA MAb.

第4節 KBAモノクローナル抗体によるLAK細胞と癌細胞との結合阻害

LAK細胞が癌細胞を破壊するためにはkiller T細胞の場合と同様に、まず第一段階として癌細胞との結合が必要とされる。従って、KBA抗体のLAK活性抑制機構として、LAK細胞と癌細胞との結合の阻害が考えられる。

LAK細胞と癌細胞との結合は、azido-fluorescein diacetate (azido-FDA)で蛍光ラベルしたLAK細胞と癌細胞とを23°Cで各時間混合培養することにより測定した。この温度では結合課程は進行するが、lethal段階は進行しないことが橋本⁷²⁾によって報告されている。その結果、KBA抗体を添加することによって、30分、2時間、4時間いずれのbinding assayにおいても、LAK細胞と癌細胞との結合が有意に阻害されることが明らかとなった(表6-2)。従って、KBA抗体は、LAK細胞の癌細胞との結合部位又は結合部位に関連した分子に対するモノクローナル抗体であると考えられる。

TABLE 6-2.

Inhibitory Effect of KBA MAb on LAK-Target Cell Binding^a

KBA MAb	% Binding ^b		
	0.5 hr	2 hr	4 hr
—	18.3	26.8	27.9
+	4.9	6.4	11.4

^a LAK cells (5×10^5) labeled with azido-FDA were mixed with MBL-2 lymphoma cells (10^6) in the presence or absence of KBA MAb and incubated for various times at 23°C.

^b Percentage binding of cells was calculated by counting more than 200 LAK cells in a fluorescence microscope. Percentage binding of cells was calculated by the formula described under Materials and Methods.

第5節 KBA抗体の各種エフェクター細胞に対する影響

KBA抗体の添加によりLAK細胞のcytotoxicityは完全に阻害することができた。そこで、次にKBA抗体がLAK細胞以外の抗腫瘍エフェクター細胞(NK細胞、活性化Mφ、CTL)の活性も阻害するか否かについて検討した。

活性化Mφ及びNK細胞はOK432投与後3日目の腹腔内浸出細胞より得、そのYAC-1に対するcytotoxicityを測定した。またCTLは、C57BL/6マウスをA/Jマウス脾細胞で二回免疫することにより得、そのRADA Iに対するcytotoxicityについて検索した。KBA抗体を、これら各種のエフェクター細胞のcytotoxicity assayの際に添加して、その阻害効果を調べた結果、図6-3より明らかなように、KBA抗体はLAK細胞の活性のみならず、NK細胞のcytotoxicityも強く阻害できることが明らかとなった。また、活性化Mφの活性も、KBA抗体によって若干抑制されたが、その阻害は低く、CTLに対しては全く阻害効果を示さ

なかった。

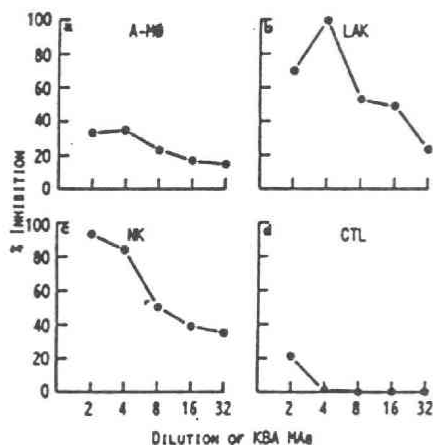


Fig. 6-3. Effect of KBA MAb on the cytotoxic activity of various types of killer cells. A-Mφ (a), LAK cells (b), NK cells (c), and CTL (d) were obtained from C57BL/6 mouse PEC or spleen cells as described under Materials and Methods. These killer cells were cocultured for 18 hr at 37°C with target cells in the presence or absence of serial diluted KBA4 MAb. Effector-to-target cell ratio was 25:1.

第 6 節 KBA 抗体で認識される LAA 抗原の分布

KBA 抗体で認識される抗原の各種リンパ系細胞における分布、並びに Thy 1.2, Ly 1, Ly2 抗原との異同について検索した。

その結果、表 6-3 に示すように、KBA 抗体で認識される LAA 抗原の強陽性細胞は、脾細胞 (11.4%)、胸腺細胞 (9.3%)、リンパ節細胞 (2.7%)、骨髄細胞 (8.9%) ではいずれも低く、LAK 細胞は 93% が LAA 抗原強陽性細胞であった。また LAA 抗原陽性細胞の分布は、Thy 1.2, Ly 1, Ly 2 陽性細胞との分布とは異なるものであった。

TABLE 6-3.

Cellular Distribution of Lymphokine-Activated Cell-Associated (LAA) Antigen, as Defined by KBA MAb^a

Cells	Percentage surface antigen-positive cells ^b			
	Thy 1.2	Ly 1.2	Ly 2.2	LAA
Thymocytes	99.3	90.0	80.9	9.3
Spleen cells	37.5	25.2	14.2	11.4
Lymph node cells	66.2	37.1	17.5	2.7
Bone marrow cells	9.7	1.8	2.5	8.9
LAK cells	94.8	20.0	56.0	93.0

^a Five distinct cell populations were obtained from C57BL/6 mice and labeled with FITC using biotinylated KBA4 MAb and FITC-conjugated avidin.

^b Measured using FACS analyzer.

各種リンパ系臓器におけるLAA抗原強陽性細胞の割合は低いものであったが、図6-4に示したFACSのパターンを見た場合、いずれのリンパ系細胞においても、蛍光強度が対照カーブよりも右方向へ平行移動しており、LAA抗原は全てのリンパ系細胞に弱いながら存在している抗原であると思われる。

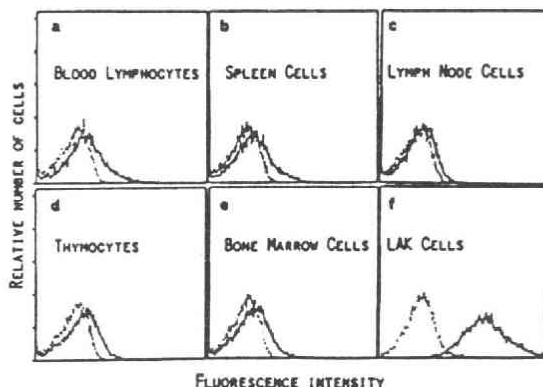


Fig. 6-4. Expression level of lymphokine-activated cell-associated (LAA) antigen in different cell population. The cells (10^6) were incubated with either medium (dim curve) or biotinylated KBA4 MAb (bright curve) for 30 min on ice. After washing with PBS 3 times, the cells were further incubated with FITC-conjugated avidin for 30 min on ice. LAA antigen expression of the cells was determined using FACS analyzer. (a) Ficoll-purified blood lymphocytes; (b) spleen cells; (c) lymph node cells; (d) thymocytes; (e) bone marrow cells; (f) LAK cells.

第7節 IL 2 刺激によるLAA抗原の増強発現

脾細胞は無刺激の状態では、わずかなLAA抗原しか有していないが、IL 2で脾細胞を活性化誘導したLAK細胞では強いLAA抗原の発現が認められている。そこで、IL 2刺激をうけた脾細胞でのLAA抗原発現の経時変化について検討した。

その結果、脾細胞を200 U/mlのIL 2存在下で培養することにより、培養2日後には強いLAA抗原の発現が認められ、培養5日後には殆んどの細胞が強いLAA抗原を発現することが判明した(図6-5)。

また、緑の蛍光を発するFITCと赤の蛍光を発するpropidium iodide (PI)でそれぞれ、細胞のLAA抗原とDNAを染め分けflow cytometryを行うことによって、Y軸のDNA合成量と相関して、X軸のLAA抗原が発現することが確認された(図6-6)。従って、LAA抗原は、IL 2によって活性化されたリンパ球のDNA合成と相関して発現されると思われる。

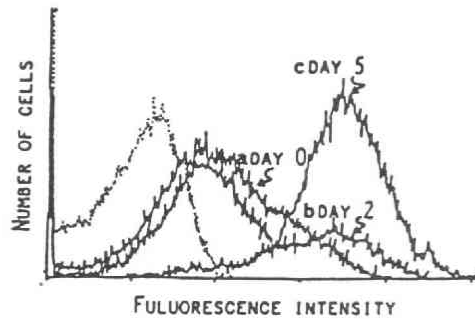


Fig. 6-5. Inducing ability of r-IL-2 on LAA antigen in spleen cells. C57BL/6 mouse spleen cells (5×10^6) were cultured in the presence of r-IL-2 (200 U/ml) for 5 days at 37°C. The cells were harvested at the indicated days. The expression level of LAA antigen on the staining cells were determined by FACS analyzer. (a) Day 0; (b) Day 2; (c) Day 5.

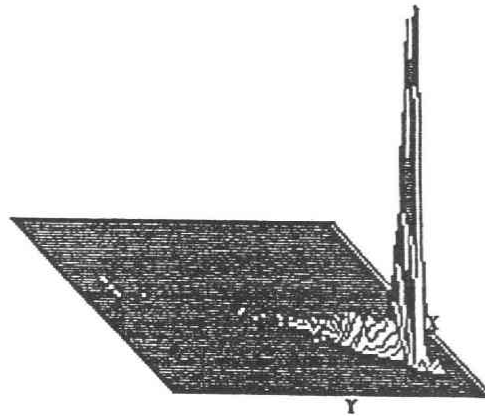


Fig. 6-6. FITC, PI を用いた two color analysis
X軸: Fluorescence intensity, Y軸: PI intensity

第 8 節 LAK 細胞と CTL における LAA 抗原発現の違い

C57BL/6 マウス無刺激 T 細胞, CTL, および LAK 細胞の LAA 抗原発現状態を FACS analyzer を用いて調べた。その結果, LAK 細胞には強い強度で LAA 抗原が発現されているのに対し, CTL においては, 無刺激 T 細胞よりも若干強い LAA 抗原が発現するのみであった (図 6-7)。この事実から, LAA 抗原は CTL に高密度で存在すると報告されている LFA-1 抗原とは異なるものであると考えられる。

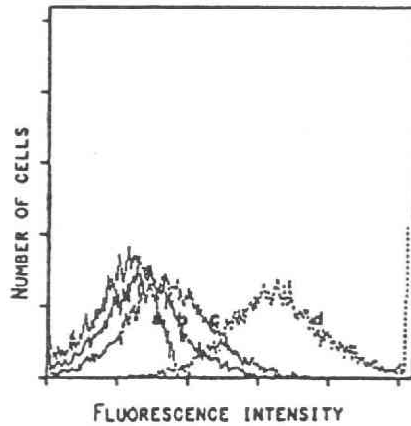


Fig. 6-7. Comparison of the expression level of LAA antigen on LAK cells, CTL, and normal T cells. Nylon-wool column-passed T cells, CTL against alloantigen, and LAK cells were treated with biotinylated KBA4 and FITC-conjugated avidin, then the expression level of LAA antigen on these cells was determined using FACS analyzer. (a) Control curve; (b) nylon-wool column passed splenic T cell; (c) CTL; (d) LAK cells.

第 9 節 LAA 抗原の解析

LAK細胞の膜表面を¹²⁵Iでラベルし、NP-40で可溶化後、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーによって、LAA抗原の解析を行った。その結果、LAA抗原は分子量180Kと95Kの二つの subunitからなるタンパク質であることが証明された(図6-8)。また、この分子は、LAK細胞を protease, tunicamycin で処理することによって消失することより、糖タンパク質であると思われる。

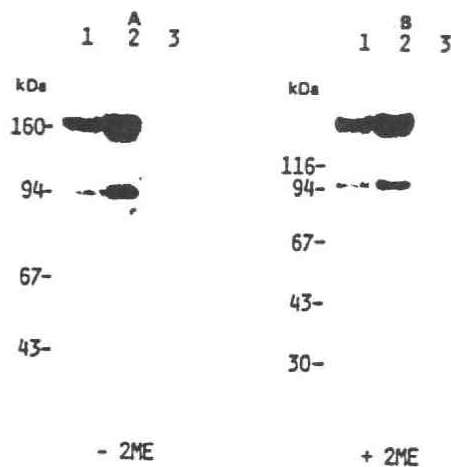


Fig. 6-8. Polypeptide analysis of immunoprecipitated LAA antigen by SDS-PAGE. LAK cells were surface-labeled with ¹²⁵I. The antigen was extracted from the cells with 0.5% NP-40, then immunoprecipitated with either KBA4, KBA6, or normal rat serum and *Staphylococcus aureus* protein A. The precipitates were assayed by SDS-PAGE before (A) or after (B) treatment with 2-mercaptoethanol (2ME). Lane 1, immunoprecipitated with KBA4; Lane 2, with KBA6; Lane 3, with normal rat serum. K: Kilodalton.

第10節 考 察

マウスLAK細胞と強く反応し、かつLAK活性を阻害しうるモノクローナル抗体の作製に成功し、LAK細胞の活性発現には、分子量約180Kと95Kの二つの subunit から成るLAA抗原が重要な役割りを有していることが明らかとなった。

KBA抗体はLAK細胞と癌細胞との結合を阻害することより、LAA抗原はLAK細胞と癌細胞との結合分子、又は結合に関連した分子であると思われる。

LAA抗原は、正常リンパ球全てに、少ないながら存在する抗原であると思われ、リンパ球をIL 2で活性化することによって、さらに増強発現される。

従来、CTLの cytotoxicity 発現に重要な分子としてはLFA-1分子が報告されており、⁷⁷⁻⁷⁹⁾ LFA-1に対するモノクローナル抗体はCTL活性を強く阻害することや、骨髄細胞の約70%の細胞と反応性を示すことが報告されている。これに対し、KBA抗体はCTLの活性には何ら影響を示さず、LAK細胞、NK細胞、活性化Mφの活性発現にのみ影響を与え、また骨髄細胞との反応性も強くない。従って、KBA抗体は、LFA-1に対する抗体とは異なった膜表面分子を認識しているものと思われた。しかし、LAA抗原の性状の解析から、LAA抗原はLFA-1抗原と同一の分子から成っていることが明らかとなった。この結果から、筆者は、KBA抗体はLFA-1分子に対するモノクローナル抗体とは異なったエピトープに対する抗体であると考えている。

KBA抗体は、現在、LAK細胞の全ての癌細胞に対する cytotoxicity を阻害することはできず、スクリーニングの際に用いたMBL-2やNK細胞の target であるYAC-1に対する活性のみを阻害できることが明らかとなってきた。従って、LAK細胞はLAA抗原上に、各癌細胞に対応しうる糖鎖構造様の分子を有し、この二つの分子で癌細胞破壊を行っていることが推定される。⁸⁴⁾ KBA抗体はLAK細胞のLAA抗原(LFA-1と相同分子)と糖鎖構造のいくつかを同時に認識した抗体であると考えられる。

LAK細胞は、LGLであり、近年、LGL細胞の中の顆粒が癌細胞破壊の最終メカニズムであることが報告されている事実と考え合わせれば、LAK細胞の癌細胞破壊機構は図6-9に示したように考えられる。すなわち、LAK細胞はLAA抗原を介して癌細胞に結合し、その後、癌細胞に対応する糖鎖構造で相手を認識し、細胞内顆粒を癌細胞に打ち込み、癌細胞を破壊する機構である。この詳細については現在なお検討中である。

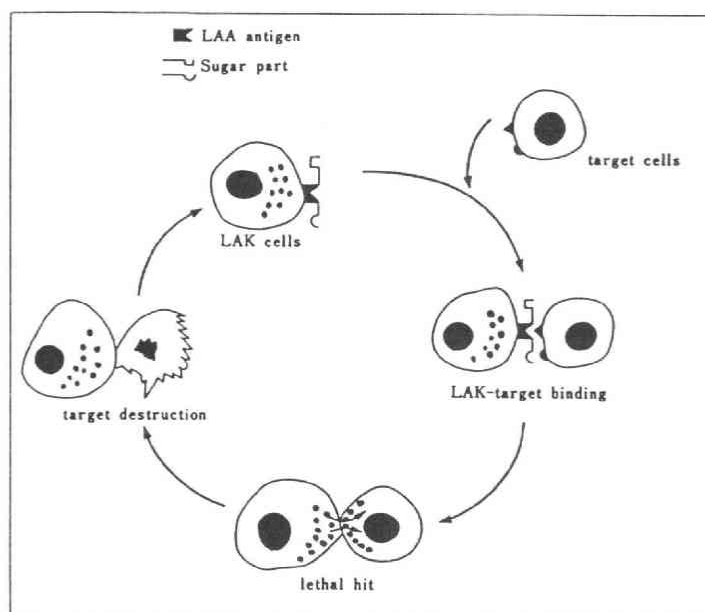


Fig. 6-9. LAK 細胞による腫瘍破壊機構の仮説

第 7 章 IL 2 の in vivo 効果

第 1 節 序 論

IL 2 は(1)T細胞やNK細胞の長期培養を可能にする,⁸⁵⁻⁸⁷⁾ (2)killer T細胞の誘導を増強する,²¹⁾ (3)LAK細胞を誘導させる,^{24,60-63)} (4)T細胞の分化を促す等の種々の免疫調節作用を有している。⁸⁸⁾ 従って、もし、IL 2 が in vivo においてもこのような作用を示しうることができれば、将来、癌や自己免疫病等の治療に応用可能であるかもしれない。しかし、現在確認されている IL 2 の作用は殆んど in vitro での現象であり、in vivo における IL 2 の作用は未だ明確にされていない。

Cheever らは Thy 1,1 congenic マウスを用いた in vivo IL 2 測定法について報告しているが、²⁵⁾この方法では in vivo で IL 2 が killer 活性を維持させることができるか否かについては検討することができない。従って、IL 2 の in vivo 投与によって癌の免疫療法が可能であるか否かを検討するためにも、より簡便な in vivo IL 2 活性法の開発が望まれる。

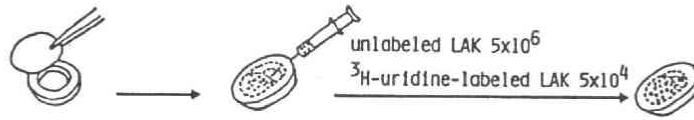
そこで本章では、筆者が新しく開発した、in vivo IL 2 活性測定法について述べ、この方法を用いて、IL 2 が in vivo においても、LAK細胞の viability や cytotoxicity を維持することができることを明らかにする。また、IL 2 が in vivo においても効果的に作用するためには、どのような投与方法が望ましいかについても検討を加え論述する。⁸⁹⁾

第 2 節 In vivo IL 2 活性の測定方法の開発

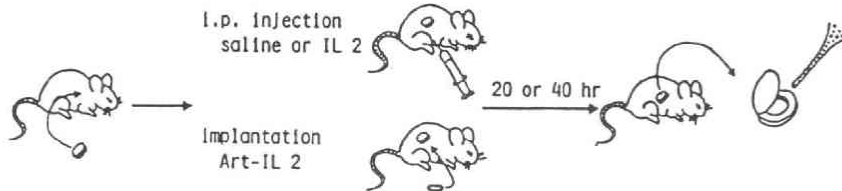
In vivo IL 2 の測定法は、IL 2 に依存的であり、かつ cytotoxicity を有した LAK細胞と、IL 2 等の可溶性因子は通過できるが、細胞は通過不可能な millipore diffusion chamber の特性を生かして考察した。その方法の概略は図 7-1 に示したとうりであり、³H-uridine で標識又は非標識した LAK細胞を diffusion chamber に封入し、この chamber をマウス腹腔内に移植し、in vivo 投与IL 2 の LAK細胞の viability、及び cytotoxicity に対する影響について検討した。

Assay for in vivo IL 2 activity

- 1) preparation of diffusion chamber containing unlabeled or ^3H -uridine-labeled LAK



- 2) in vivo transfer of chamber and administration of IL 2



- 3) measure of IL 2 in vivo

- a) viability of LAK cells

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{cpm of the cells recovered from chamber}}{\text{cpm of the cells enclosed in chamber}} \times 100$$

- b) cytotoxicity of LAK cells

Fig. 7-1. Scheme for in vivo IL 2 assay.

第3節 In vivo 投与 IL 2 の LAK 細胞 viability に対する影響

マウス脾細胞を各濃度の recombinant IL 2 (r -IL 2) の存在下で培養し、LAK細胞誘導の際の r -IL 2の至的濃度を検討した。その結果、LAK細胞の誘導は r -IL 2の濃度依存的に増強され、 200 U/ml の r -IL 2濃度でプラトーに達した(図7-2)。従って、以下の実験では 200 U/ml の r -IL 2を用いて誘導したLAK細胞を用いた。

このLAK細胞を ^3H -uridineでラベルし、chamber内に封入し、マウス腹腔内に移植した後、 r -IL 2を投与し、そのLAK細胞 viability に対する影響を調べた。その結果、chamber 移植マウスに生理食塩水を投与した場合には、10, 20, 40時間後に経時的な放射活性の減少、すなわち、LAK細胞の viability の低下が認められたが、 2000 U の r -IL 2投与マウスにおいては、この viability の減少が有意に抑制された(図7-3)。

2000 U の r -IL 2を用いた場合には、in vivoでのLAK細胞 viability 維持効果がさほど強いものではなかったが、in vivo投与の r -IL 2濃度を増加させることによって、濃度依存的にLAK細胞の viability がin vivoで維持できることが明らかとなった。

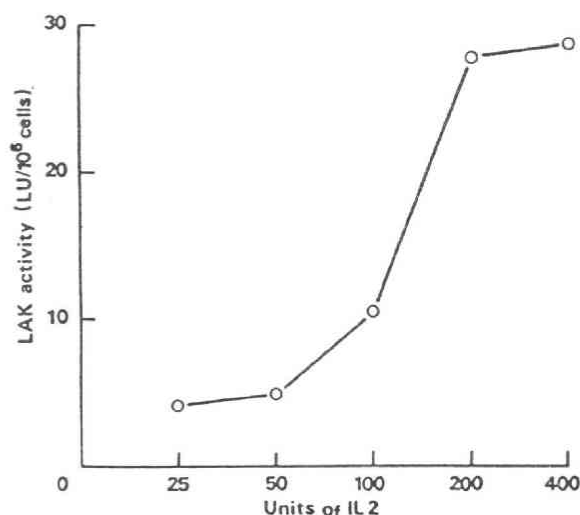


Fig. 7-2. Effect of r-IL-2 on the induction of LAK cells in vitro. C57BL/6 mouse spleen cells (5×10^6) were cultured with various concentrations of r-IL-2 for 5 days at 37°C. The cytotoxicity of LAK cells against MBL-2 lymphoma cells was measured by the [3 H]uridine method. LU was calculated as described in Materials and Methods.

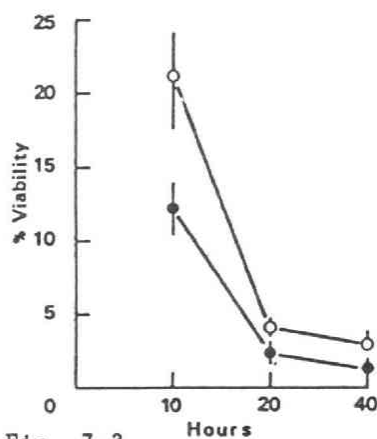


Fig. 7-3.

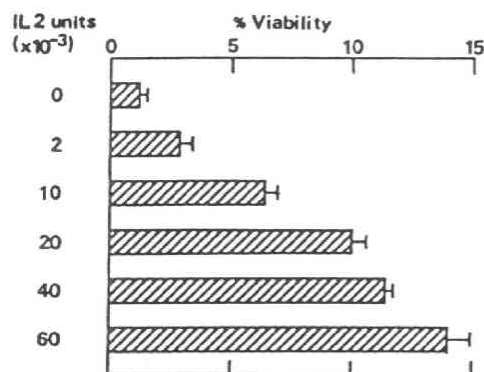


Fig. 7-4.

Effect of an i.p. injection of r-IL-2 on the viability of LAK cells enclosed in diffusion chambers. [3 H]uridine-labeled LAK cells (5×10^4) enclosed in a Millipore diffusion chamber were inserted into the peritoneal cavity of a mouse and the mouse was treated with saline (●) or 2000 U of r-IL-2 (○). A number of such mice were periodically sacrificed, and the radioactivity of LAK cells in the chambers was determined by a standard liquid scintillation technique. % Viability was calculated as described in Materials and Methods.

第4節 In vivo 投与 IL 2 の LAK 活性におよぼす影響

^3H -uridine で非標識の LAK 細胞 5×10^6 個を含む millipore diffusion chamber をマウス腹腔内に移入し、即ちに saline 又は γ -IL 2 を投与し、24 時間後に、chamber 内の LAK 細胞を回収し、EL 4 に対する cytotoxicity を検索した。

その結果、図 7-5 に示すように、当初、250 LU の活性を有した LAK 細胞は、saline 投与マウスにおいては、著しくその活性を失った。しかし、in vivo に IL 2 を投与することによって、濃度依存的に LAK 活性が維持できることが明らかとなった。

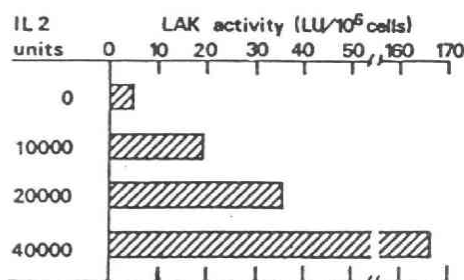
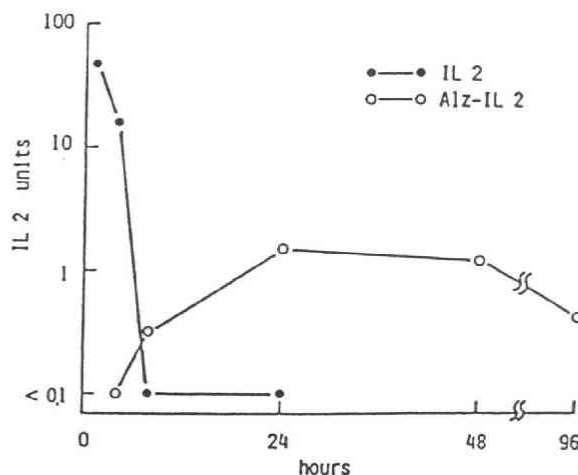


Fig. 7-5. Effect of r-IL-2 on the cytotoxic activity of LAK cells enclosed in diffusion chambers. Unlabeled LAK cells (5×10^6) enclosed in diffusion chambers were inserted into the peritoneal cavities of mice and the animals were treated with saline or various concentrations of r-IL-2. After 20 h, the LAK cells were harvested from the diffusion chambers and their cytotoxicity was determined by the [^3H]uridine method using EL-4 leukemia cells as the target. The initial LU of the LAK cells was 250.

第5節 IL 2 の徐放的投与による血中 IL 2 濃度の維持

IL 2 は一般に、in vivo においては腎でクリアランスされ、わずか3分の半減期で生体内から排出されることが報告されている。従って、IL 2 の in vivo 効果発現を期待するためには、何らかの方法を用いて、血中 IL 2 濃度を長く維持することを考えなければいけない。

そこで、筆者は、ALZET社製のミニ浸透圧ポンプを用いて、血中 IL 2 濃度が維持できるか



否かについて検討した。図 7-6 に示したように、マウスに 20000 U の γ -IL 2 を s.c. 投与した場合には、投与後 8 時間で、血中 IL 2 活性は消失した。しかし、同量の γ -IL 2 を浸透圧ポンプに封入し、マウス背部皮下に埋め込み、IL 2

Fig. 7-6. Duration of serum IL 2 levels by administration of slow-releasing r-IL 2

を投与した場合には、IL 2 活性は非常に低いものの、長時間にわたって血中 IL 2 活性が維持できた。

第 6 節 IL 2 の徐放的投与による LAK 細胞の viability 及び cytotoxicity の維持

前節において、徐放的 IL 2 の投与により、長時間、IL 2 の血中濃度が保たれることを明らかにした。そこでさらに、徐放的 IL 2 の投与によって、IL 2 の一回投与よりも効果的に、LAK 細胞の viability 及び cytotoxicity が in vivo において維持できるか否かについて、筆者が考案した in vivo IL 2 活性測定法を用いて検討した。

その結果、IL 2 の一回投与では in vivo で LAK 細胞の viability を維持するためには、高濃度の IL 2 投与が必要であったが、IL 2 を浸透圧ポンプから徐放的に投与した場合には、IL 2 を一回投与した場合の約 1/10 の用量でも十分な in vivo での viability 維持効果が認められた (図 7-7)。

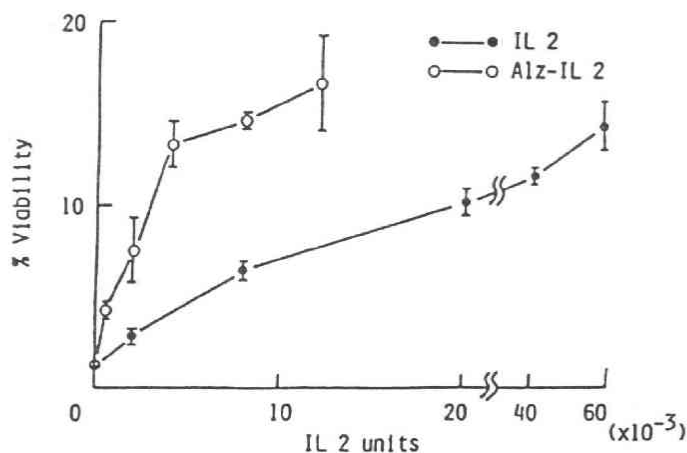


Fig. 7-7. Effect of IL 2 on the viability of in vivo transferred LAK cells

また、図 7-8 に示したように、徐放的 IL 2 の投与により、saline 及び IL 2 の一回投与群よりも、効果的に LAK 細胞の cytotoxicity を in vivo で維持することができた。以上の結果より、in vivo での IL 2 の活性発現のためには、一回投与よりも、IL 2 の徐放的投与が望ましいと思われる。

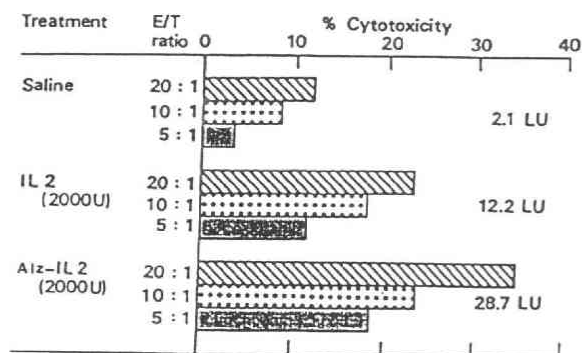


Fig. 7-8. Effect of IL 2 on the cytotoxicity of in vivo transferred LAK cells

第 7 節 考 察

IL 2 は種々の免疫調節機能を有し、将来、癌や自己免疫病等の治療に有用であることが期待されている。しかし、この可能性を検討するためには、まず始めに、IL 2 が本当に in vivo においても作用しうるか否かを検討できる方法を確立しなければならない。

本章において、筆者は、LAK細胞と millipore diffusion chamber を用いた新しい IL 2 活性の測定法を開発し、この方法を用いることによって in vivo においても IL 2 が LAK細胞の viability や cytotoxicity を維持できることを明らかにした。

現在まで、in vivo IL 2 活性測定法については、Cheever らによって、Thy 1.1 congerneic マウスに Thy 1.2 の T 細胞を移入して、in vivo IL 2 投与の影響を調べる方法が報告されている。²⁵⁾ この方法は全身的な IL 2 の影響を検索できる点においては筆者の方法より勝っているが、IL 2 の in vivo 投与によって、移入した Thy 1.2 マーカーを有した細胞のみならず、宿主の Thy 1.1 陽性細胞も活性化される可能性があり、in vivo IL 2 投与による killer 活性維持効果を検索することは困難であると思われる。従って、この点においては筆者の方法がすぐれていると考えられる。

IL 2 は高濃度投与した場合には、一回投与によっても in vivo 効果を発現するが、少量の IL 2 の一回投与では、その効果を期待することはできない。これは、IL 2 の生体内での半減期が約 3 分で非常に速く、in vivo 投与された IL 2 の殆んどが腎でクリアランスされるためである。⁹⁰⁻⁹¹⁾

将来、IL 2 を人の治療に応用する場合、大量の IL 2 の投与を続けた場合、IL 2 の副作用が引き起こされることも予想され、治療への応用を考える前に、まず好適な IL 2 の投与方法について検討する必要がある。

筆者は、第5，6節において，IL 2を浸透圧ポンプから徐放的に投与することによって血中のIL 2濃度が長期間にわたって維持できることを明らかにし，さらに，徐放的IL 2の投与によって，IL 2の一回投与よりも効果的にin vivoでのLAK細胞のviabilityやcytotoxicityを維持できることを証明した。

現在，IL 2を用いたヒトやマウスにおける癌の治療実験の報告がいくつかなされているが，^{92,93)}これらの系においてはいずれもIL 2の一回投与が行なわれており，徐放的IL 2の投与を行なうことにより，さらに良好な結果が得られる可能性があるだろう。

将来，IL 2を治療に応用するためには，患者の免疫機能と照合し，IL 2を人為コントロールのもとに，徐放的に投与することが望ましいと思われる。

第 8 章 IL 2 の癌免疫療法への応用

第 1 節 序 論

IL 2 は T 細胞を分裂増殖させるのみではなく、直接的に、IFN- γ の誘導を介して間接的に生体内フェクター細胞を活性化できる。従って、IL 2 が *in vivo* においても、*in vitro* において確認されている種々の免疫作用を示しうるのであれば、既に biological response modifier (BRM) として臨床に用いられている免疫賦活剤よりも、さらに効果的な BRM として癌の治療特に応用可能になるかもしれない。

IL 2 の癌免疫療法への応用を考えた場合、以下に述べたいいくつかの問題を解決する必要がある。

- 1) 臨床応用に用いるだけの純粋な IL 2 を大量に入手可能であるのか。
- 2) IL 2 は生体内でも本当に作用することができるのか。
- 3) IL 2 の *in vivo* 投与によって、局所及び全身的な免疫療法の効果を増強しうるか。

1) の点については、現在、遺伝子組み換え技術の進歩によって、recombinant ヒト IL 2 の大量入手も可能となり、問題は解決された。

また、2) の点についても、前章で述べたように、IL 2 の投与方法を工夫することによって *in vivo* においても IL 2 の効果が期待できることが明らかとなった。

残る問題は、IL 2 が直接的に又は何らかの免疫療法との協同によって、*in vivo* での抗腫瘍効果を増強発現させることができるか否かという問題である。

Cheever らは *in vitro* で長期培養した killer T 細胞クローンと IL 2 を用いることによって、癌の治療が可能であることを始めて報告した。¹¹⁾ しかし、この系で用いられている FBL-3 は正常マウスでは継代不可能な特殊なモデルであり、この治療モデルが全ての癌に応用可能であるか否かは断言し難い。また、この系は FBL-3 を *i.p.* 移植し、CTL も *i.p.* 移入した、いわゆる local adoptive immunotherapy の系であり、IL 2 の *in vivo* 投与が全身的な癌の免疫療法にも有効であるか否かはまだ明らかにされていない。

そこで本章で筆者は、*in vivo* 効果発現のために有効である徐放的 IL 2 の投与と LAK 細胞との併用による局所での adoptive immunotherapy について始めに検討した。⁹⁴⁻⁹⁶⁾

また、C57BL/6 マウス白血病細胞 MBL-2 を用いた全身的な治療モデルを確立し、IL 2 の *in vivo* 投与が全身的な癌の治療系においても有効であるか否かについても検索した。^{97,98)} さらに、IL 2 の単独投与による抗腫瘍効果についても合わせて検討を加えた。

第2節 Recombinant IL 2とLAK細胞の併用による抗腫瘍効果

前章で述べたように、IL 2の一回投与では投与8時間後に血中のIL 2活性は消失し、十分なIL 2のin vivo効果を期待することはできない。しかし、IL 2を浸透圧ポンプから徐放的に投与することによって、血中IL 2濃度を長時間維持できるのみならず、in vivoにおいて、LAK細胞のviability及びcytotoxicityを維持できることが明らかとなった。そこで、本節においては、IL 2の徐放的投与とLAK細胞のin vivo移入によって癌の治療が可能であるか否かについて検討した。

C57BL/6マウスに同系白血病細胞であるEL 4 (2×10^4)をi.p. 接種し、図8-1に示したような各種の治療を行った。Salineのみを含む浸透圧ポンプを移入した対照群ではEL 4接種22日後に全例が死亡した。また、IL 2単独及びLAK細胞単独投与群においても、有意な延命効果は認められなかった。IL 2の頻回投与 ($6660 \text{ U} \times 3$)とLAK細胞との併用によっては平均生存率が25.8日にやや延長されたが統計的には有意なものではなかった。しかし、IL 2 (20000 U)を浸透圧ポンプから徐放的に投与し、LAK細胞をEL 4に対して200:1の割合で移入した群においては、著明な延命効果が認められ、約30%のマウスは完治した。

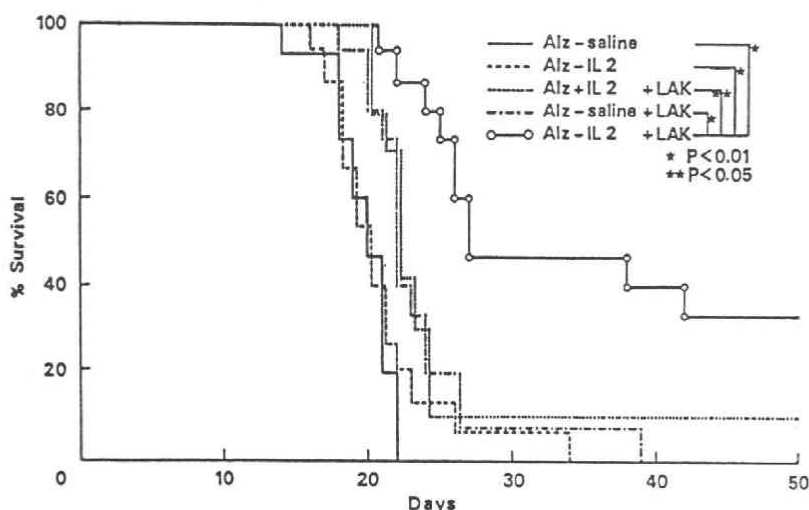


Fig. 8-1. Adoptive-immunotherapy by using LAK cells and slowly-released recombinant interleukin 2.

第3節 MBL-2を用いたsystemic adoptivechemoimmunotherapyモデルの確立

前節において、LAKとIL 2を用いたEL 4白血病細胞の局所での癌治療モデルの確立について述べた。しかし、IL 2の癌治療への応用が可能であるか否かを確かめるためには、IL 2が全身的な癌治療効果を増強しうるか否かについて検討する必要がある。

そこで、本節ではC57BL/6 マウス由来白血病細胞を用いた systemic adoptive - chemoimmunotherapy モデルの確立を目的として実験を行った。

C57BL/6マウスをMMC処理したMBL-2 (5×10^6) で二回免疫した後に、各細胞数の MBL-2 生細胞を移植すると、図8-2に示したように、免疫C57BL/6マウスは 2×10^6 、 5×10^6 個、いずれのMBL-2の接種した場合にも完全にMBL-2の増殖を阻止した。 10^7 個のMBL-2を接種した場合には、免疫マウスにおいてもMBL-2は生着したが、対照群に比較すると、著明な増殖の抑制が認められた。従って、MMC処理MBL-2でC57BL/6マウスを in vivo 免疫することによって、同系腫瘍に対する抗腫瘍エフェクター細胞が誘導可能であることが確認された。

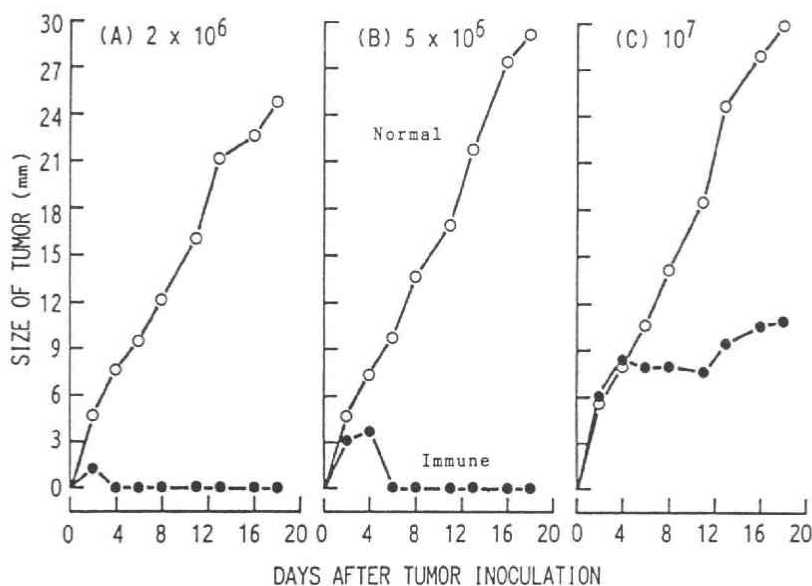


Fig. 8-2. Induction of anti-tumor effector cells in vivo by immunization with MMC-treated MBL-2 lymphoma cells.

MBL-2 免疫C57BL/6 マウスの腹腔内浸出細胞及び脾細胞のMBL-2に対する cytotoxicityを検索した結果、腹腔内マクロファージや腹腔内T細胞は強い cytotoxicityを示したが、免疫マウス脾細胞には強い cytotoxicityは認められなかった(図8-3)。

しかし、最近、in vitroにおける cytotoxicityと in vivoにおける抗腫瘍活性は必ずしも一致しないことが報告されており、in vitroでは cytotoxicityを示さない免疫マウス脾細胞も in vivoにおいては強い抗腫瘍活性を示す可能性がある。

図8-4は、この点に関して検討した結果である。C57BL/6マウスにMBL-2 (2×10^6) を i.d. 接種し、腫瘍塊が約8~10mmに達した、7日後から治療を開始した。Cyclophosphamide

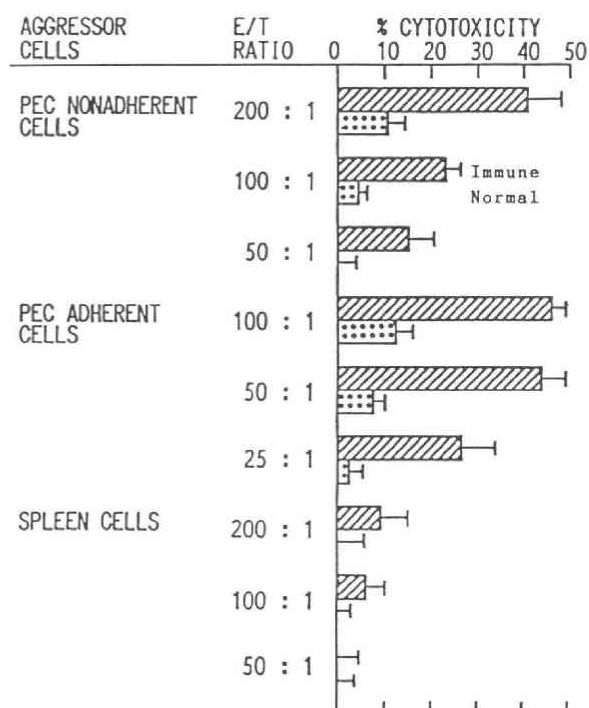


Fig. 8-3. Cytotoxic activity of PEC and spleen cells obtained from immune and normal mice.

(CY)のみ、免疫脾細胞(IM-spl)のみでは、いずれの場合にもMBL-2の増殖抑制は認められなかった。しかし、CY投与と、IM-splとの併用によって著明な抗腫瘍効果が認められ、IM-splを 10^8 , 5×10^7 , 2×10^7 個移入した場合にはそれぞれ、100%, 100%, 80%の割合で担癌マウスは完治した。しかし、IM-spl, 10^7 個の移入ではCYと併用した場合においても著明な治療効果は期待できなかった。

また、図8-5に示したように、本治療モデルにおいてはCY 25mg/kg 及び 50mg/kg の投与では、IM-splの抗腫瘍効果は期待できず、CY 100mg/kg 以上の投与が必要であることが確認された。

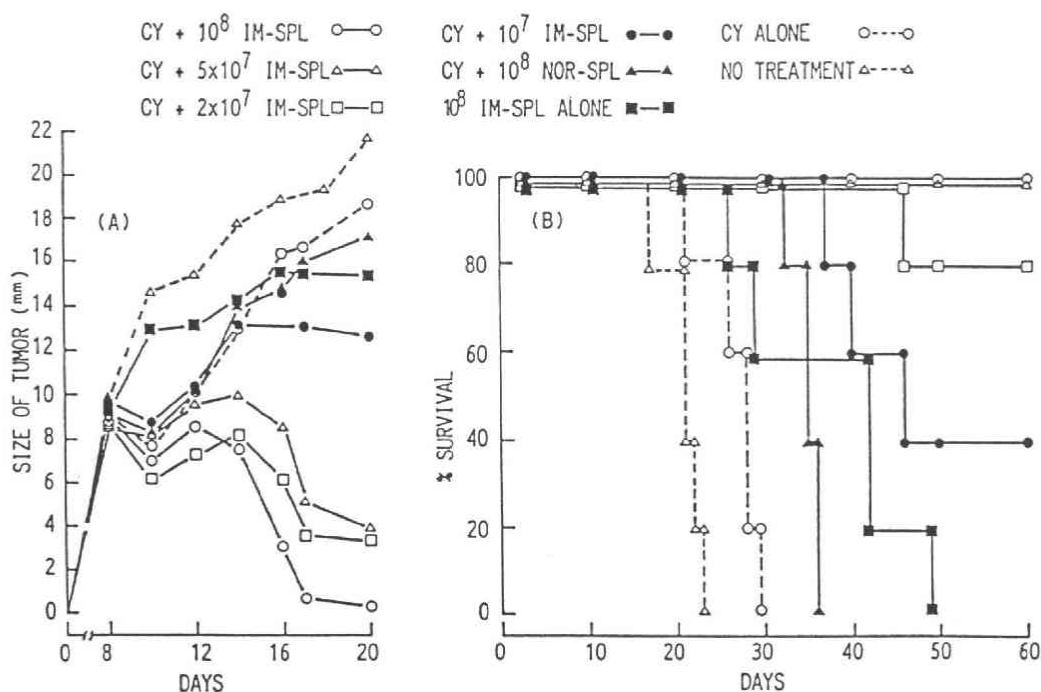


Fig. 8-4. Adoptivechemoimmunotherapy of MBL-2 lymphoma cells.

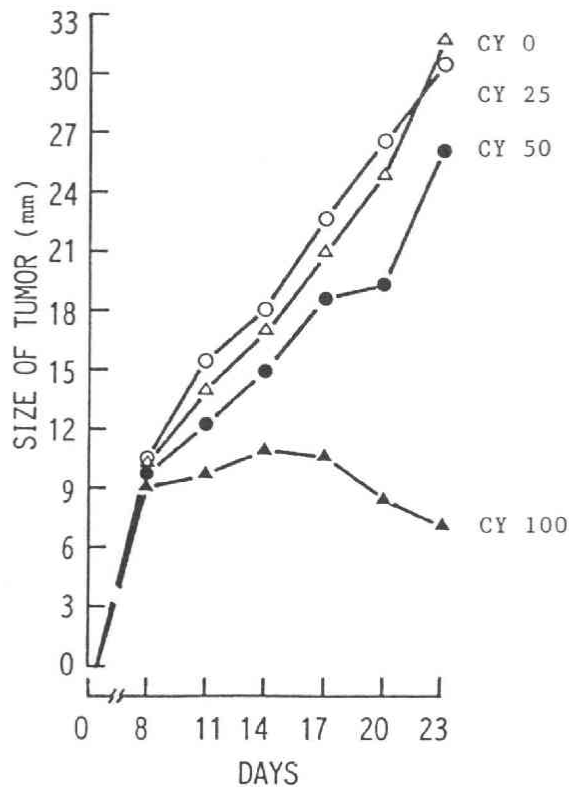


Fig. 8-5. Effect of cyclophosphamide on adoptivechemoimmunotherapy.

第4節 Recombinant IL 2の徐放的投与による systemic adoptivechemoimmunotherapyの増強

前節で述べたように、IM-spl 10^7 個とCYとの併用によっては著明な抗腫瘍効果は認められなかった。しかし、in vivoのIL 2投与によって、腫瘍局所に到達したIM-splの増殖が促がされれば、少数のエフェクター細胞の移入によっても、強い抗腫瘍効果が期待できるはずである。そこで、CY投与MBL-2担癌マウスに 10^7 個のIM-splを移入し、さらにIL 2を徐放的に投与することによって、systemic adoptivechemoimmunotherapyが増強可能であるか否かについて検討した。

腹部皮内にMBL-2 (2×10^6) を接種した担癌マウスにCY及びIM-spl (10^7)を用いた治療を行った場合、20%のマウスしか治療せず、この方法とIL 2 (21000 U)一回投与とを併用しても、その治療率の増加は認められなかった。しかし、IL 2 (3000 U)を腹部の腫瘍周辺局所に毎日、一週間投与することによって、約80%のマウスが治癒し、CYとIM-spl

を用いた治療の効果を増強することができた。しかし、IL 2 (3000 U) を背部皮下から全身的に投与した場合には約40%のマウスしか治癒しなかった。

これに対して、IL 2 を浸透圧ポンプから徐放的に投与した場合には、腫瘍周辺局所及び背部皮下から投与した場合のいずれにおいても、それぞれ80%、60%のマウスが治癒し、連日のIL 2 投与よりも、徐放的IL 2 の投与により、さらに効果的に adoptivechemoimmunotherapy の効果を増強できることが確認された (図8-6)。

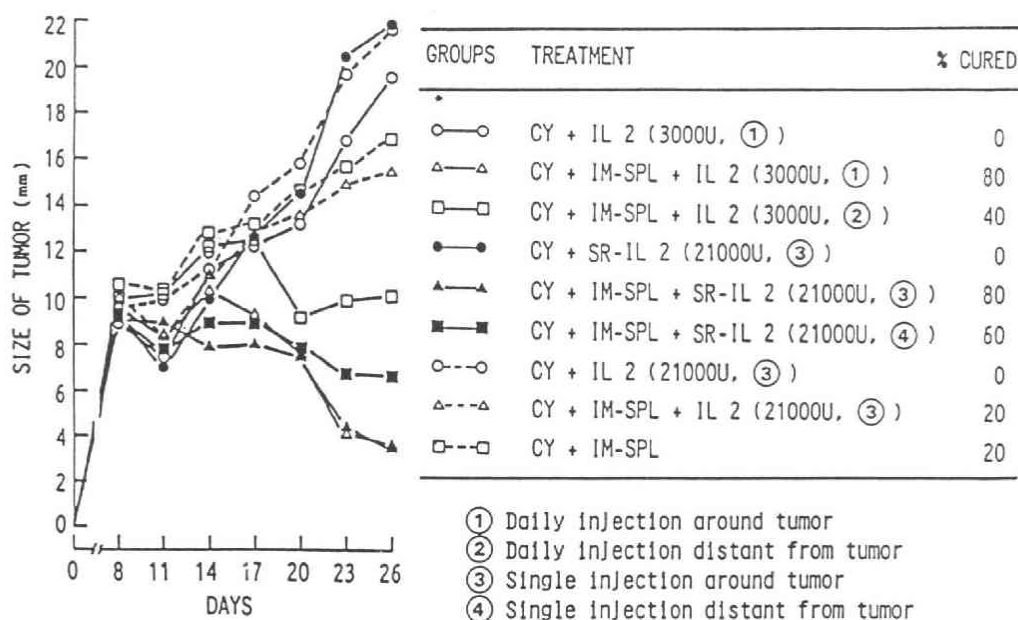


Fig. 8-6. Augmentation of the efficacy of ACIT by in vivo administration of slowly released recombinant IL 2.

第5節 Recombinant IL 2 の腫瘍内投与による腫瘍増殖の抑制

C57BL/6 マウス由来 melanoma B16 を用いて、IL 2 単独投与の腫瘍増殖に対する影響を検討した。その結果、B16 (2×10^6) を接種し、7 日後から IL 2 (3000 U) を1週間、腫瘍局所に投与することによって、著明な腫瘍の増殖抑制効果が認められた (図8-7)。従って、IL 2 は単独でも宿主の抵抗性を高め、抗腫瘍効果を発現すると思われる。

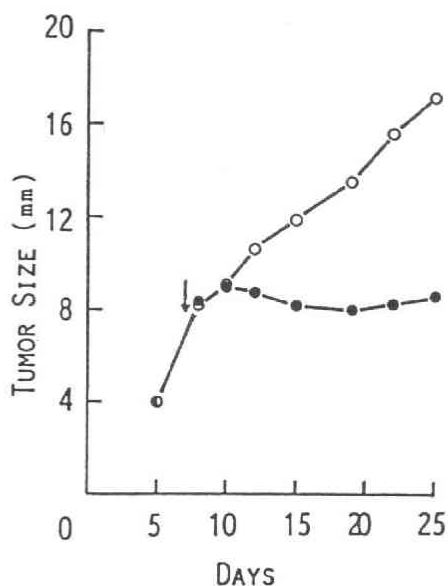


Fig. 8-7. Inhibition of tumor growth by i.t. injection of recombinant IL 2.

第6節 考 察

癌の免疫療法の一つとして、adoptiveimmunotherapy があり、従来はkiller T 細胞を用いて行なわれてきた。しかし、同系腫瘍に対するkiller T 細胞の誘導は必ずしも容易なことではなく、この方法を用いた癌の免疫療法は困難であると考えられていた。

LAK細胞は、この問題を解消した夢のエフェクター細胞であり、in vitro で大量に誘導可能で、かつ各種の癌細胞に強いcytotoxicityを示すことができる。従って、LAK細胞がin vivo においても抗腫瘍効果を発現できれば、より簡単なadoptiveimmunotherapyの実現が可能になるかもしれない。

LAK細胞はIL 2に対する依存性が非常に高く、in vivo 投与した場合には短時間で死滅してしまう。従って、LAK細胞単独で抗腫瘍活性を期待することは困難であり、IL 2との併用が必要とされる。しかし、in vivo 投与されたIL 2は約3 min の半減期でクリアランスされるため、IL 2のin vivo 効果発現のためには徐放的投与が望ましいと考えられた。

EL 4を用いた局所でのadoptiveimmunotherapyのモデルにおいて、IL 2の頻回投与とLAK細胞との併用では、LAK細胞単独の場合と同様に、有意な延命効果が認められなかったのも、IL 2が投与後すぐにクリアランスされたためと考えられる。事実、IL 2を浸透圧ポンプから徐放的に投与した場合には、in vivo IL 2 assay の結果と合致して、LAK細胞との併用によって強い抗腫瘍効果が認められた。

Rosenberg らは LAK 細胞と IL 2 の投与によって、B16 melanoma 肺転移が著明に抑制され、LAK 細胞が全身的投与によっても有効であることを示している。^{99, 100)} しかし、この系においては、移入された LAK 細胞が肺で捕獲され、その後に肺の局所で B16 に対して cytotoxicity を示す特殊な系であると思われる。筆者の実験結果では、LAK 細胞は全身的投与ではさほど有効ではないと思われる。従って、将来、LAK 細胞と IL 2 の併用による治療が行なわれうるのであれば、脳腫瘍や肝癌等の local adoptive immunotherapy が可能な腫瘍に限られると思われる。

MBL-2 を用いた systemic adoptive chemoimmunotherapy のモデルにおけるエフェクター細胞は、他の実験から Thy 1.2⁺, Ly 1⁺, 2⁺ の killer T 前駆細胞であると考えられ、この細胞は in vitro では cytotoxicity を示さないが、in vivo においては強い抗腫瘍活性を示すことができる。MBL-2 免疫脾細胞を in vitro で再び MBL-2 で刺激することによって、MBL-2 に特異的な killer T 細胞が簡単に誘導できることより、IM-spl 中の killer T 前駆細胞は MBL-2 担癌マウスに移入された後、即ちに腫瘍局所に homing し、その場で癌抗原の刺激をうけて killer T 細胞に分化し、in vivo で強い抗腫瘍活性を発現するものと思われる。

これまで多くの研究者により、adoptive immunotherapy の際に CY 投与の併用が有効であることが示されており、筆者も同様の結果を得た。¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾ CY 投与により担癌動物の suppressor T 細胞が除去されることが報告されており、CY の癌治療増強効果の一因として考えられる。¹⁰⁵⁾ しかし、ラットの系において CY 25mg/kg 及び 50mg/kg の投与によっても suppressor T 細胞が除去できるのに対し、¹⁰⁶⁻¹⁰⁷⁾ MBL-2 治療系においては 100mg/kg 以上の投与が必要なことより、adoptive chemoimmunotherapy における CY の役割は単に suppressor T 細胞の除去だけでなく、癌細胞に対する直接的な影響もあると思われる。

MBL-2 を用いた治療系において、10⁷ 個の IM-spl を移入した場合には、強い抗腫瘍効果は認められなかった。これは 10⁷ 個の IM-spl に含まれる killer T 前駆細胞が少ないためと思われる。しかし、IL 2 を腫瘍周辺に投与することによって、IM-spl, 10⁷ 個と CY を用いた治療効果が増強されることから、IL 2 は in vivo においても killer T 細胞の分化又は増殖を助け、癌治療効果を増強させることができると思われる。

また、MBL-2 を用いた systemic adoptive chemoimmunotherapy の系においても、徐放的 IL 2 投与の有効性が証明され、今後、人の癌治療へ IL 2 を応用する際にも、単に IL 2 を大量投与するのではなく、患者の免疫状態と照らし合わせ、IL 2 を人為的コントロールの下に投与することが望ましいと考えられる。

第9章 総 括

IL 2はCon A等の抗原刺激により helper T細胞から産生される可溶性因子であり、その産生 kinetics は種によって異なる。Con Aに対して高い応答性を示すマウス脾細胞においては、Con A刺激24時間以後に活発な IL 2の吸収が始まり、48時間後の培養上清中には IL 2活性は検出できない。これに対し、Con Aに比較的不応答性のラットにおいては、培養上清中の IL 2活性は48時間後にピークに達し、それ以降に IL 2は培養系から消失する。

同種白血病細胞RADA1に対する特異的 killer T細胞は IL 2の存在下で培養することによって約8ヶ月にわたり cytotoxicityを失うことなく長期継代維持することができた。しかし、同系腫瘍BMC2に対する killer T細胞は約20日でその活性を失い、IL 2の存在下でもさほど長く培養することはできなかった。In vitroで IL 2の存在下で分裂増殖させた killer T細胞は in vivoにおいても、強い抗腫瘍活性を示し、IL 2が癌免疫療法へ応用可能であることが強く示唆された。

Con A刺激ラット脾細胞培養上清より得た IL 2を硫酸分画で濃縮し、さらにSephacryl S-200で精製することにより、ラット IL 2は分子量22,000~26,000のタンパク質であることが証明された。精製した IL 2は、マウス脾細胞やリンパ節細胞に対して mitogenic効果を示し、この効果は α -MMの添加によって阻害されないことや、recombinant IL 2を用いても同様の効果が観察されることから、混在するCon A等の影響ではなく IL 2そのものの効果であると考えられる。脾細胞やリンパ節細胞と異なり、末分画胸腺細胞は IL 2に対して強い応答性を示さない。しかし、胸腺細胞を percoll不連続密度勾配でFr 1, Fr 2, Fr 3の三つの分画に分離することにより、低比重のFr 2の胸腺T細胞亜群が IL 2の刺激に反応して分裂増殖することが明らかとなった。

Fr 1の胸腺T細胞亜群は $Ly1^{+}, 2^{-}, PNA^{-}$ の細胞群から成り、Con A, IL 2いずれの刺激に対しても応答性を示した。これに対して、Fr 2, Fr 3の胸腺細胞はいずれも $Ly1^{-}, 2^{+}, PNA^{+}$ の細胞表面マーカーを有し、IL 2単独、Con A単独の刺激では分裂増殖を示さなかった。しかし、IL 2とCon Aの両方で刺激した場合には、Fr 1の細胞と同様に、Fr 2の細胞も高い応答性を示した。Fr 3の胸腺細胞は、Con A, IL 2, および両者のいずれの刺激に対しても応答性を示さず、in vitroで培養することによって、他の細胞群よりも早期に死滅することが明らかとなった。従って、末梢リンパ球は、Fr 1又はFr 2のいずれかの胸腺細胞亜群から導入され、Fr 3の胸腺細胞は胸腺内で死滅する細胞群であると考えられる。

IL 2はT細胞増殖活性の他に、各種の癌細胞に対して cytotoxicityを示すLAK細胞を誘

導する作用もあることが示された。LAK細胞は細胞表面マーカーから判断すればThy1.2⁺ Ly2⁺, asialo GM1⁻のkiller T細胞と同様のkiller T細胞と同様のkiller細胞であるが以下の点でkiller T細胞とは異なると思われる。

- 1) LAK細胞はIL2刺激2日後に産生され、killer T細胞の産生kineticsよりも早い。
- 2) Killer T細胞は特異的なcytotoxicityを示すが、LAK細胞は各種の癌細胞に対して幅広いcytotoxicityを示す。
- 3) Killer T細胞産生においてはMφの存在が不可欠であるが、LAK細胞誘導においてはMφは不必要である。

脾細胞をIL2で刺激することによりIFN-γの産生が促がされ、IFNの産生とLAK細胞の産生との間には相関関係があり、IFNの産生はIL2刺激初期にピークに達することより、LAK細胞産生においては、killer T細胞と同様に培養初期のIFNの産生が必要であると思われる。

LAK細胞の誘導は脾細胞からのみならず、マウス、メチルコラントレン誘発肉腫BMC2、及びヒト胃癌内に浸潤したリンパ球からも可能であった。腫瘍内浸潤リンパ球から誘導したLAK細胞は脾細胞から誘導したLAK細胞と同様に、T細胞マーカー（ヒト：OKT3⁺, OKT8⁺, マウス：Thy1.2⁺, Ly2⁺）を有したlarge granular lymphocyte (LGL)であった。また、このLAK細胞は脾細胞から誘導したLAK細胞よりも強いcytotoxicityを示し、in vivoにおいても強い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。

LAK細胞は膜表面上の何らかの分子で数多くの癌細胞を認識し、破壊するものと思われるが、筆者は、LAK細胞に強く反応し、かつLAK活性を阻害するモノクローナル抗体、KBAを作製し、LAK細胞の癌細胞破壊機構について検討した。LAK細胞のcytotoxicity assayの際にKBA抗体を添加することにより、LAK細胞と癌細胞とのbindingが阻害され、LAK活性が強く抑制されることより、KBA抗体はLAK細胞が癌細胞にbindingするために必要な分子に対する抗体であると考えられる。KBA抗体で認識される分子は正常リンパ系細胞にもわずかながら存在するが、リンパ球をIL2で活性化することによって、さらに増強誘導されることより、筆者はこの抗原をlymphokine-activated cell-associated (LAA) antigenと名づけた。LAA抗原は分子量約180Kと95Kの2つのsubunitからなる分子から構成され、LAK細胞のcytotoxicityを阻害するのみならず、T細胞の種々の免疫応答も抑制することから、T細胞の活性化においても重要な分子であると考えられる。

IL2は種々の免疫調節作用を有し、癌等の治療に有用であると思われる。しかし、実際にこの応用が実現可能であるか否かを検討するためには、まず、IL2がin vivoにおいてもin vitroと同様の作用を示すのか否かを確かめなければいけない。筆者は、IL2依存的で

強い cytotoxicity を有した LAK 細胞と、可溶性因子のみの通過が可能な millipore diffusion chamber の特製を生かした新しい in vivo IL 2 活性の測定法を開発し、IL 2 の in vivo 効果について検討した。その結果、以下の点が明らかとなった。

- 1) IL 2 の in vivo 投与により、濃度依存的に LAK 細胞の viability が維持された。
- 2) IL 2 の in vivo 投与により、LAK 細胞の cytotoxicity も in vivo で維持することができた。
- 3) IL 2 の in vivo 効果発現のためには、IL 2 の一回投与よりも、浸透圧ポンプからの徐放的投与が有効である。

In vivo 投与された IL 2 は s.c. 投与 8 時間後には血中から消失してしまう。しかし、浸透圧ポンプから同量の IL 2 を徐放的に投与した場合には、投与後 96 時間後においても血中 IL 2 活性を検出することができた。これらの結果から、IL 2 は in vivo においても抗腫瘍活性を有したエフェクター細胞の cytotoxicity や viability を維持できることが証明され、IL 2 の in vivo への応用のためには投与方法の工夫が必要であることが示された。

徐放的 IL 2 の投与により、新しい癌の免疫療法が可能であるか否かについて、まず LAK 細胞との併用による local adoptive immunotherapy モデルを作製し検討した。LAK 細胞は IL 2 に対する依存性が高いため in vivo に移入後、直ちに死滅し、LAK 細胞単独投与では EL 4 担癌マウスの治療は困難である。また、IL 2 の頻回投与と LAK 細胞との併用によっても良好な治療結果を得ることはできなかった。しかし、浸透圧ポンプからの徐放的 IL 2 の投与と LAK 細胞との併用により、有意な延命効果が認められ、30% のマウスは完全治癒した。

さらに、徐放的 IL 2 の投与が systemic adoptive immunotherapy モデルにおいても増強効果を示すか否かを、MBL-2 を用いた治療系を確立して検討した。MBL-2 で免疫した C57BL/6 マウスの脾細胞 (IM-spl) は in vitro においては MBL-2 に対する cytotoxicity を示さないが、in vivo においては CY との併用で強い抗腫瘍活性を示す。この治療系における in vivo エフェクター細胞は Thy 1. 2^+ , Ly 1^+ , Ly 2^+ の killer T 前駆細胞であると思われる、in vivo に移入された killer T 前駆細胞が腫瘍局所で killer T 細胞に分化し、MBL-2 を破壊するものと思われる。IM-spl, 2×10^7 個以上の移入によっては CY との併用による抗腫瘍効果が期待できるが、 10^7 個の IM-spl の移入では、含まれる killer T 前駆細胞の数が少なく十分な治療結果を得ることはできなかった。しかし、この系においても、 10^7 個の IM-spl と徐放的 IL 2 の投与を併用することによって、顕著な治癒率の増加が認められた。従って、徐放的 IL 2 の投与によって、in vivo 移入された抗腫瘍エフェクターのクローンの拡大が可能であることが強く示唆された。

また、IL 2 は B16 腫瘍内に単独投与した場合にも強い抗腫瘍効果を示すことより、IL 2 は

in vivo においても、担癌宿主の抗腫瘍エフェクター細胞を直接的に活性化できることが推定された。

以上のことから、IL 2 は投与方法によっては、局所的及び全身的な癌の免疫療法へ応用可能であることが強く示唆された。現在、遺伝子組み換え技術の発展により、IL 2 の大量生産も既に可能になっていることから、今後 IL 2 徐放剤等を開発することによって、IL 2 は近い将来必ず、癌等の治療薬として有用なものになると信ずる。

第10章 実験材料及び方法

第1節 第2章付属実験

1-1 動物

C57BL/6マウス, A/Jマウスは船橋農場より購入し, SDラットは日本チャールズリバー社より購入した。使用した動物は全て雄性で5~8週令のものをを用いた。

1-2 培地

RPMI 1640 培地 10.4 gにペニシリンG (100 U/ℓ), 硫酸カナマイシン (60 μg/ml), 炭酸水素ナトリウム (1 mg/ml), HEPES (10 mM), ビルビン酸ナトリウム (1 μM), L-グルタミン (300 μg/ml)を加え, 1 ℓの脱水イン水に溶解し, さらに10% fetal calf serum (FCS)を加えたものを培地として使用した。

1-3 癌細胞

A系マウス由来白血病細胞 RADA 1はA/Jマウスに腹腔内移植し継代した。また, 筆者が樹立したメチルコラントレン誘発肉腫 BMC 2はC57BL/6マウスにs.c.移植し継代した。

1-4 リンパ球の調整

脾臓, リンパ節および胸腺を動物から無菌的に取り出し, 培地中でピンセットでしごき, 浮遊細胞とする。100×gで5分間遠心後, 混在する赤血球を, 0.83% NH₄Cl溶液 (Tris-HCl緩衝液)で37℃, 2分間処理して溶血させ除去する。直ちに培地で2回洗浄したリンパ球を実験に用いた。

1-5 Interleukin 2 (IL 2)の産生

脾細胞を 5×10^6 /mlに調整し, ラットの場合は36-48時間, マウスの場合は24時間, Con A (10 μg/ml)の存在下で培養する。培養後, 400×g, 10分間遠心し, 培養上清を集め, IL 2として使用した。

1-6 IL 2 assay

IL 2活性はIL 2依存性T細胞クローン, T572を用いて行った。T572は筆者により昭和57年2月にC57BL/6マウスCon A blastより軟寒天法にてクローン化された細胞である。T572細胞浮遊液 (5×10^4 /ml) 0.1 mlを96 well plateに分注し, さらにIL 2 sample 0.1 mlを加え, 32時間培養後の³H-thymidine (0.5 μCi/well)の取り込み量を指標としてIL 2活性を測定した。

1-7 同種白血病細胞に対するkiller細胞の誘導

同種白血病細胞 RADA 1 (10⁷個)でC57BL/6マウスを, s.c. i.pで2回免疫し, 7-10

日目の脾細胞を killer T 細胞として用いた。

1-8 同系腫瘍に対する killer T 細胞の誘導

C57BL/6マウスに移植継代した BMC 2 肉腫を無菌的に摘出し、Dispase (500 U/ml) で 37℃, 30分間処理し浮遊細胞とした後、さらに 60 μ g/ml の mitomycin C で 37℃, 40分間処理した細胞を stimulator として用いた。マウス脾細胞 5×10^6 個と stimulator 5×10^4 個を 2 ml の培地に懸濁し、丸底チューブ中で 37℃, 6日間培養し、BMC 2 に対する killer T 細胞を誘導した。

1-9 Winn テスト

前述の方法で誘導した killer T 細胞をラット IL 2 の存在下で 2週間培養し、分裂増殖させた killer T 細胞 2×10^6 個と BMC 2 10^4 個を混ぜ合わせ、C57BL/6マウスに s.c. 投与し腫瘍の増殖を測定した。対照群としては、脾細胞及び脾細胞を IL 2 で培養したものを用いた。

第 2 節 第 3 章付属実験

2-1 Percoll 不連続密度勾配による胸腺細胞の分離

動物、培地、細胞の調整は第 1 節の方法に従った。胸腺を無菌的に摘出し、 5×10^7 /ml の細胞浮遊液に調整する。Percoll 不連続密度勾配は、ファルマシア社の Percoll 9 溶に 1.5 M NaCl 1 溶を加え 100% Percoll 溶液とし、この溶液を 10% FCS 加 RPMI 培地で希釈し、80%, 67%, 60%, 55% Percoll を作製し、各々 2 ml ずつを 10 ml チューブに静かに重層して不連続密度勾配を作成した。この密度勾配に胸腺細胞浮遊液 1 ml を重層し、4℃, $400 \times g$ で 20 分間遠心し、胸腺細胞亜群を分離した。この方法を 2 回くり返し、0-55%, 55-60% の画分を混ぜ合わせた細胞群を Fr 1 細胞、60-67% の細胞群を Fr 2、67-80% の細胞群を Fr 3 として実験に用いた。

2-2 ラット IL 2 の精製

ラット脾細胞を 5×10^6 /ml に調整し、3% FCS, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol を含む培地中で、36時間 Con A (10μ g/ml) の存在下で培養する。培養後 $400 \times g$, 10分間遠心し、培養上清を集め、直ちに 50% 飽和の硫酸分画を行う。4℃で一晩放置した後、沈査を遠心除去し、再び 50-90% 飽和の硫酸分画を行い、生じた沈査を最少量の PBS で溶解する。5 ℓ の PBS で 2 回透析したサンプル 10 ml を Sephacryl S-200 ゲルろ過法にて精製し、得た IL 2 画分を限外ろ過器 (PM-10) を用いて濃縮し、再び Sephacryl S-200 で精製したものを IL 2 として用いた。

2-3 IL 2 及び Con A に対する応答性

リンパ球を 10^6 /ml に調整し、0.2 ml ずつ 96 well plate に分注し、これに精製した IL 2 (450 U/ml) 又は Con A (50μ g/ml) を 10 μ l 加え、各時間 37℃ で培養する。反応終了 4 時間前

に ^3H -thymidine ($0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$) を加え、Skatron セルハーベスターにて細胞をグラスフィルターに回収し、フィルターを乾燥後トルエンシンチレーター 5 ml を加えたバイアルビンに移し、Beckman 液体シンチレーションカウンターにして測定した。

2-4 抗体と補体を用いた cytotoxicity

脾細胞浮遊液 ($5\times 10^6/\text{ml}$) と 100 倍希釈したモノクローナル抗 Thy 1, 2 抗体 (Olae F7D5), および 4 倍希釈したモルモット血清を 1:1:1 の割合に混ぜ、 37°C , 40 分間処理して行った。

第 3 節 第 4 章 付属実験

3-1 IL 2 と Con A による mitogenic 反応

動物, 培地, 細胞調整並びに胸腺細胞の分離等については前述したので略く。胸腺細胞の IL2 と Con A に対する応答性は胸腺細胞浮遊液 ($10^6/\text{ml}$) 0.2 ml に精製 IL 2 ($450\text{ U}/\text{ml}$) $10\mu\text{ l}$ と $50\mu\text{ g}/\text{ml}$ Con A $10\mu\text{ l}$ を加え、 37°C で 32 時間培養後、4 時間の ^3H -thymidine のとりこみ量を測定しておこなった。

3-2 S I T 活性の測定

胸腺細胞浮遊液 ($10^6/\text{ml}$) を 0.2 ml ずつ 96 well plate に分注し、培養開始時及び培養 12 時間後の細胞の DNA 合成を 4 時間の ^3H -thymidine ($0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$) のとりこみ量を指標として S I T 活性を測定した。

3-3 Thy 1.2 抗原密度の検討

未分画及び Percoll 分画胸腺細胞を各濃度のモノクローナル抗 Thy 1.2 抗体と補体の存在下で 2-4 の方法で処理し、トリパンブルー dye exclusion テストにより死細胞を算定し、Thy 1.2 抗原密度の検討を行った。

3-4 細胞表面マーカーの検索方法

胸腺細胞浮遊液 ($10^6/\text{ml}$) $50\mu\text{ l}$ に抗 Thy 1.2 抗体及び抗 Ly 1.2, Ly 2.2, 抗体 (愛知がんセンター, 高橋利忠先生より供与) $50\mu\text{ l}$ を加え、 0°C , 30 分間 incubate する。P B S で 3 回洗浄後、F I T C ラベルした抗マウス immunoglobulin 抗体 (Dakopack F 232) $50\mu\text{ l}$ を加え、さらに 0°C , 30 分間 incubate し、3 回洗浄後、良く水を切り、50% グリセリン P B S に懸濁して蛍光顕微鏡下で陽性細胞数を算定した。P N A レセプターの有無は F I T C ラベルした P N A レクチン (東北大学歯学部微生物学教室, 熊谷勝男先生より供与) を用い、同様の方法で直接細胞を蛍光ラベルして陽性細胞数を算定した。

第4節 第5章付属実験

4-1 癌細胞

動物, 培地, IL 2精製, IL 2活性の測定法については略く。メチルコラントレン誘発肉腫 BMC 2, BMC 4, BMC 6 A, BMC 8はC57BL/6マウスにs.c. 移植継代した。また, RADA1白血病細胞はA/Jマウスにi.p. 移植し継代した。他の癌細胞, YAC-1 (H-2^a), BW5147 (H-2^k), RL♂1 (H-2^d), P815 (H-2^d), Meth A (H-2^d)は10% FCS加 PRMI 1640 培地中でin vitro継代した。

4-2 Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の誘導

C57BL/6マウス脾細胞 5×10^6 個を 5×10^{-5} M, 2-MEを含んだ培地2 mlに懸濁し, Costar 12 well plateに分注し, Sephacryl S-200 ゲルろ過法で精製したIL 2 (450 U/ml) を0.2 ml加え, 4~5日間培養する。抗原の存在下でLAK細胞を誘導する場合は, mitomycin C 処理したBMC 2, 2×10^5 個加え, IL 2の存在下で同様に培養する。

4-3 Cytotoxicity assay

Killer細胞のcytotoxicityは橋本らの³H-uridine法¹⁰⁸⁾改良法により測定した。癌細胞を³H-uridine (1 μ Ci/ml)の存在下8時間培養して放射標識する。この癌細胞浮遊液(10^4 /ml) 0.2 mlを加え, 37℃, 18時間混合培養する。培養後, チューブを遠心し, 細胞を5% TCA溶液で2回洗浄し, TCA不溶性画分を得る。さらにこの画分にSoluen 350 (Packard 社) 0.2 mlを加え, 一晚室温に放置し溶解させ, トルエンシンチレーターにてバイアルビンに移し, 残存放射活性を測定した。% cytotoxicityは以下の式により算出した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \left(1 - \frac{\text{癌細胞とkiller細胞を混合培養した場合のcpm}}{\text{癌細胞のみ培養した場合のcpm}} \right) \times 100$$

4-4 Interferon (IFN) assay

IFN活性は元東北大学医学部細菌学教室(現在, 中外製薬中央研究所) 齊藤元男先生に測定していただいた。L細胞浮遊液(10^5 /ml)を50 μ lとIFN sample 50 μ lをplateに分注し, 37℃で24時間培養する。培養後, 牛水疱ウィルス(VSV)溶液50 μ lを加え, さらに48時間培養し, VSVにより形成されるプラーク数を数え, プラーク形成阻止活性からIFN活性を測定した。¹⁰⁹⁾

4-5 抗体と補体によるcytotoxicityテスト

抗Thy 1.2抗体(Olac F7D5), 抗Ly 1.2抗体(Cedarlane, CG16), 抗Ly 2.2抗体(Cedarlane AD4)および抗asialo GM₁抗体(東北大学歯学部微生物学教室, 熊谷勝男先生より供与)を用い, 2-4の方法に従い行った。

第5節 第6章付属実験

5-1 癌細胞

BMC 2, RADA 1は1-3の方法で継代した。また、白血病細胞MBL-2(H-2^b), YAC-1(H-2^a)およびMeth A ad細胞はin vitro 培養で継代した。Meth A ad細胞は浮遊性Meth A fibrosarcoma から筆者によって樹立された subcloneである。

5-2 Recombinant interleukin 2

遺伝子組み換え操作によって作製された recombinant IL 2 (r-IL 2) は塩野義製薬より供与された。この r-IL 2 は 5×10^6 U/mg の活性を有している。

5-3 Hybridoma の作製

C57BL/6マウス脾細胞由来 LAK細胞, 2×10^7 個を i.p. 投与することによって, SDラットを2週間おきに2回免疫し, さらに 4×10^7 個の LAK細胞で i.p., i.v. の免疫を行った。最終免疫3日後にラット脾臓を無菌的に取り出し, 1-4の方法で脾細胞浮遊液を調整する。脾細胞とマウス myeloma, p3×63 Ag8.653 との融合はKohlerとMilsteinらの方法に従い,¹¹⁰⁾ 脾細胞 10^8 個と p3×8.653, 2×10^7 個を50%ポリエチレングリコールを用いて融合した。融合後, 5×10^{-5} M の 2-MEを含む培地に懸濁し, 4枚の96 well plate に0.2 mlずつ分注した。翌日, 培養上清100 μlを静かに除去し, 100 μl の hypoxanthine (1.0×10^{-4} M), aminopterin (4.0×10^{-7} M), thymidine (1.6×10^{-5} M) を含む HAT 培地を加える。この操作を3日おきに繰り返し, HAT 抵抗性のハイブリドーマーを選別する。ハイブリドーマーのスクリーニングは後述するように, 培養上清中の LAK 活性阻害能の有無によって行い, 活性を有している抗体を産生する細胞は限界希釈法によって直ちにクローン化した。

5-4 Killer 細胞の誘導

LAK細胞はC57BL/6マウス脾細胞を200 U/ml の r-IL 2 の存在下で4~5日間培養して誘導した。活性化マクロファージ及びNK細胞はOK432 (1 KE/mouse, 中外製薬より供与) 投与後3日目の腹腔内浸出細胞より得, シャーレ付着性の細胞群を活性化マクロファージとして, また, シャーレ及びナイロンウール非付着性の細胞群をNK細胞として用いた。アロ抗原に対する cytotoxic T lymphocyte (CTL) はC57BL/6マウスをA/Jマウス脾細胞 5×10^7 個で2回免疫し, 5~8日後の脾細胞をナイロンウールカラムを通過させた細胞を用いた。

5-5 モノクローナル抗体による cytotoxicity の阻害

Cytotoxicity assay は96 well plate を用いた改良法で行った。すなわち, 4-3の方法で ³H-uridine でラベルした癌細胞浮遊液 (4×10^4 / ml) 0.1 ml とエフェクター細胞の浮遊液 0.1 ml を丸底の96 well plate で, 37℃, 18時間培養。培養後, Skatron セルハーベスターで細胞を回収し, 4-3の方法で放射活性を測定し, % cytotoxicity を算定した。モノク

ローナル抗体の cytotoxicity 阻害活性を検索する場合は、癌細胞とエフェクター細胞を 0.1 ml の培地に懸濁し、抗体、0.1 ml の存在下で同様の cytotoxicity assay を行なうことによって阻害活性を測定した。

5-6 LAK細胞と癌細胞との binding assay

LAK細胞 ($10^6/ml$) を $10\mu g/ml$ の azido-fluoresceindiacetate (azido-EDA) で $37^\circ C$, 10分間処理し、蛍光ラベルされた LAK細胞 (5×10^5 個) と癌細胞 (2×10^6 個) を混合し、 $100 \times g$ で 5分間遠心し、ペレットのまま $23^\circ C$ で 0.5 ~ 4 時間 incubate する。培養後、パスツールピペットで 15回軽く攪拌し、蛍光顕微鏡下で癌細胞に binding した蛍光ラベル LAK細胞の割合を算定する。% binding は以下の式で計算した。

$$\% \text{ binding} = \frac{\text{癌細胞に binding した蛍光ラベル LAK細胞数}}{\text{全ての蛍光ラベルされた LAK細胞数}} \times 100$$

5-7 FACS analyzer を用いた flow cytometry

Thy1.2, Ly 1.2, Ly 2.2 抗原は Becton-Dickinson 社製の FITC ラベル抗体を用い、直接蛍光抗体法で調べた。すなわち、細胞のペレット (10^6 個) に、 $10\mu l$ の各抗体を加え、 $0^\circ C$, 30分間, incubate し、PBS で 3回洗浄後、FACS analyzer を用いて解析した。KBA 抗体を用いる場合は、リンパ球にビオチン化 KBA 抗体 ($100\mu g/ml$) $20\mu l$ を加え、 $0^\circ C$, 30分間 incubate し、PBS で 3回洗浄後、細胞ペレットに FITC アビジン (船越社製 $1mg/ml$ を 50倍希釈) $100\mu l$ を加え、さらに $0^\circ C$, 30分間 incubate し、PBS で 3回洗浄後、検体として用いた。FACS analyzer を用い、 10^4 個中の陽性率を算定した。

5-8 抗原の解析

LAK細胞の膜表面を Mitchell らの方法¹¹¹⁾ に従い ^{125}I でラベルし、0.5% NP-40を含む NET buffer (0.15M NaCl, 0.04M EDTA, 0.04M Tris, 0.2mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) で可溶化、 $105000 \times g$ で 1時間遠心し、膜分画を得る。この膜分画から正常ラット血清、ウサギ抗ラット immunoglobulin (Dako pack) および 10% staphylococcus aureus Cowan I (SAC) 溶液を用いて非特異的にラット血清に吸着する画分を除く。次に KBA 抗体を加え、 $4^\circ C$ で overnight 反応させ、さらにウサギ抗ラット血清を加え、 $4^\circ C$, 6時間放置し、免疫複合体を形成させ、SAC 溶液を加え免疫沈降させる。0.5% NP-40, 0.1% BSA および 10mM NaI を含む NET buffer で 5回遠心洗浄後、2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 中で加熱することによって抗原を溶出する。この sample を Laemmli らの方法¹¹²⁾ に従って、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い、さらに Kodak X-Omat AR film を用いてオートラジオグラフィーを行い抗原解析を行っ

た。

第6節 第7章付属実験

6-1 Millipore diffusion chamber

直径13mm, 厚さ2mmで針穴のついたプラスチックリング(Millipore 社)を70%エタノールで滅菌し, この両面にオートクレーブ滅菌したミリポアフィルター($0.22\mu m$)を張り合わせる。針穴から0.1mlの細胞浮遊液を加え, MFセメント(Millipore 社)で穴をとじ実験に用いる。

6-2 In vivo IL 2活性の測定法

1) LAK細胞のviability維持効果: LAK細胞を $200U/ml$ のIL 2と 3H -uridine ($1\mu Ci/ml$)の存在下で8時間培養して 3H ラベルする。このLAK細胞, 5×10^4 個を0.1mlのsalineに懸濁し, diffusoin chamberに封入, 直ちにC57BL/6マウス腹腔内に外科的手術を施し移植する。マウスにIL 2又はsalineをi.p.投与し, 24時間後に再びchamberを取り出し, chamber内LAK細胞の残存放射活性を測定する。% viabilityは以下の式で算出した。

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{Chamber 内から回収された LAK細胞の cpm}}{\text{Chamber 内に封入した LAK細胞の cpm}} \times 100$$

2) LAK細胞のcytotoxicity維持効果: 非標識のLAK細胞 5×10^6 個をchamber内に封入し, マウス腹腔内に移植後, 上述の方法と同様の方法で処置し, chamber内のLAK細胞を20時間後に回収して, そのEL 4に対するcytotoxicityを測定した。

6-3 IL 2の徐放的投与

Recombinant IL 2 ($10^5 U/ml$)を200 μl 封入したALZET社ミニ浸透圧ポンプ(モデル2001)を皮下又は腹腔内に移植し, IL 2を徐放的に投与した。この浸透圧ポンプは1 $\mu l/hr$ の速度で内容物が徐放的に放出されるようになっている。

6-4 血中IL 2活性の測定

IL 2投与したマウス血清をsalineで4倍希釈し, 0.22 μl のミリポアフィルターを用い滅菌し, $-80^\circ C$ に保存する。このsampleを培地で2倍希釈し, 各々のIL 2活性を1-6の方法で測定する。IL 2 unitはアメリカNIHのJurkat IL 2を1 unitとした。

第7節 第8章付属実験

7-1 Recombinant IL 2とLAK細胞の併用によるadoptiveimmunotherapy

C57BL/6マウス脾細胞($5\times 10^6/ml$)を $200U/ml$ の γ -IL 2の存在下で5日間培養しLAK細胞を誘導した。EL 4, 2×10^4 個をi.p.移植したマウスを翌日, 以下の方法で処置し治

療を行った。① saline 封入浸透圧ポンプのみを腹腔内移植する。②浸透圧ポンプを腹腔内移植し、さらに IL 2 と LAK細胞を i.p. 投与する。③ IL 2 封入浸透圧ポンプのみを移植する。④ saline を封入した浸透圧ポンプを移植し、LAK細胞を i.p.投与する。⑤ IL 2 を封入した浸透圧ポンプを移植し、LAK細胞を i.p.投与する。

7-2 MBL-2を用いた systemic adoptivechemoimmunotherapy

C57BL/6マウスを $60\mu\text{g}/\text{ml}$ の mitomycin C で 30分処理したMBL-2 (5×10^6 個)で2回免疫し、さらに 5×10^6 個のMBL-2で最終免疫、8日後の脾細胞を免疫脾細胞として用いた。C57BL/6マウスに 2×10^6 個のMBL-2を腹部皮内に移植、7日目にCY $100\text{mg}/\text{kg}$ を i.p. 投与し、翌日さらに各細胞数のIM-splを i.v.移入して治療実験を行った。腫瘍の増殖は、腫瘍の長径と短径を測定し、その平均値で表わした。

7-3 徐放的IL 2の投与

IL 2を封入した浸透圧ポンプを6-3の方法で作製し、腹部の腫瘍周辺局所又は背部の腫瘍遠隔部位に皮下移植し、徐放的IL 2の投与を行い、治療増強効果を検討した。

7-4 IL 2の腫瘍内投与

B16 melanoma の i.v. 移植を繰り返して得られた subclone B16-meta を 2×10^6 個、C57BL/6マウスの腹部皮内に移植し、7日後からIL 2を3000 U、毎日腫瘍内投与して治療を行った。

謝 辞

本研究にあたり，終始御指導と御鞭撻を賜りました東北大学薬学部教授橋本嘉幸先生に深く感謝致します。

なお本実験に当たり，多大の便宜と有益な御助言をいただきました東北大学歯学部教授熊谷勝男先生並びに同大学鈴木隆司博士に心から感謝いたします。

また，本研究の共同研究者であります，元東北大学薬学部大学院生齊藤實，小堤弘行，内山也寸志，現東北大学薬学部大学院生八木秀樹，元東北大学薬学部卒研究生富樫裕二，元東北大学薬学部研究生後藤真喜子並びに現東北大学薬学部卒研究生，太田 稔，佐藤直子諸氏に深く感謝いたします。

また，多大な御協力をして下さいました東北大学薬学部衛生化学の皆様方，recombinant IL 2 を供与して下さいました塩野義製薬に心から感謝いたします。

最後に，常に私の心の支えとなってくれた妻・ナホ子，息子・謙一，娘・真理子に心から感謝する。

引用文献

- 1) Jerne, N.K., Eur.J.Immunol., 1, 1 (1971).
- 2) Katz, D.H., Hamaoka, T., & Benacerraf, B., J.Exp.Med., 137, 1405 (1973).
- 3) Rosenthal, A.S., & Sevach, E.M., J.Exp.Med., 138, 1194 (1973).
- 4) Zinkernagel, R.W., & Doherty, P.C., Nature (London), 251, 547 (1974).
- 5) Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N., & Tonegawa, S., Nature, 309, 757 (1984).
- 6) Hidrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A., & Davis, M.M., Nature, 308, 149 (1984).
- 7) Kranz, D.M., Saito, H., Heller, M., Takagaki, Y., Haas, W., Eisen, H.N., Tonegawa, S., Nature, 313, 752 (1985).
- 8) Masuko, T., & Hashimoto, Y., J.Natl.Cancer Inst., 67, 431 (1981).
- 9) Isii, Y., Takami, J., & Kikuchi, K., Cancer Res., 44, 4053 (1984).
- 10) Hashimoto, Y., Sugawara, M., Masuko, T., & Hojo, H., Cancer Res., 43, 5328 (1983).
- 11) Cheever, M.A., Greenberg, P.D., Fefer, A., & Gillis, S., J.Exp. Med., 155, 968, (1982).
- 12) Cerottini, J.C., & Brunner, K.T., Adv. Immunol., 18, 67 (1974).
- 13) Delestro, F., & Haskill, J.S., J.Immunol., 121, 1007 (1978).
- 14) Hibbs, J.B., Science, 180, 868 (1973).
- 15) Fidler, I.J., Kataoka, T., & Hanna Jr., M.G., Cancer Res. 36, 4459 (1976).
- 16) Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., & Lavrin, D.H., Int.J. Cancer, 16, 230 (1975).
- 17) Sendo, F., Aoki, T., Boyse, E.A., & Buafo, C.K., J.Natl.Cancer Inst., 55, 603 (1975).
- 18) Gillis, S., & Smith, K.A., Nature, 268, 154 (1977).

- 19) Morgan, D.A., & Ruscetti, F.W., *Science*, 193, 1007 (1976).
- 20) Rosenberg, S.A., Spiess, P.J., & Schwarz, S., *J.Immunol.*, 121, 1946 (1978).
- 21) Baker, P.E., Gillis, S., Ferm, M., & Smith, K.A., *J.Immunol.*, 123, 2704 (1978).
- 22) Watson, J., & Mochizuki, D., *Immunol. Rev.* 51, 257 (1980).
- 23) Wagner, H., Rollinghoff, M., Schwallier, R., Hardt, C., & Pfizenmaier, K., *Nature*, 280, 405 (1979).
- 24) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H., & Rosenberg, S.A., *J.Exp. Med.*, 155, 1823 (1982).
- 25) Cheever, M.A., Greenberg, P.D., Irle, C., Thompson, J.A., Urdal, D.L., Mochizuki, D.Y., Henney, C.S., & Gillis, S., *J.Immunol.*, 132, 2259 (1984).
- 26) Taniguchi, T., Matsui, M., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., & Hamuro, J., *Nature*, 302, 305 (1983).
- 27) Talmadge, J.E., Schneider, M.E., & Adams, J., *Proc.LXXV Annu. Meeting Am.Assoc. Cancer Res.*, 25, 238 (1984).
- 28) Fernandez-Cruz, E., Woda, B.A., & Feldman, J.D., *J.Exp. Med.*, 152, 823 (1980).
- 29) Berenson, J.R. , Einstein, A.B.Jr., & Fefer, A., *J.Immunol.*, 115, 234 (1975).
- 30) Cheever, M.A., Greenberg, P.D., & Fefer, A., *J.Immunol.*, 121, 2220 (1978).
- 31) Bonnard, G.D., Yasaka, K., & Jacobson, D., *J.Immunol.*, 123, 2704 (1979).
- 32) Uchiyama, T., Broder, S., & Waldmann, T.A., *J.Immunol.*, 126, 1396 (1981).
- 33) Leonard, W.J., Depper, J.M., Uchiyama, T., Smith, K.A., Waldmann, T.A., & Greene, W.C., *Nature*, 300, 267 (1982).
- 34) Nikaido, T., Shimizu, A., Ishida, N., Sabe, H., Teshigawara, K.,

- Maeda, M., Uchiyama, T., Yodoi, J., & Honjo, T., *Nature*, 311, 631 (1984).
- 35) Gillis, S., & Watson, J., *Immunol.Rev.*, 54, 81 (1981).
- 36) Shaw, J., Caplan, B., Paetkau, V., Pilarski, L.M., Delvitch, T.L., & McKenzie, I.F.C., *J.Immunol.*, 124, 2231 (1980).
- 37) Larsson, E.L., *J.Immunol.*, 128, 742 (1982).
- 38) Narimatsu, H., & Saito, K., *J.Immunol.*, 126, 95 (1981).
- 39) Gillis, S., Baker, P.E., Ruscetti, F.W., & Smith, K.A., *J.Exp.Med.*, 148, 1098 (1978).
- 40) Dennert, G., *Nature*, 287, 47 (1980).
- 41) Larsson, E.L., *J.Immunol.*, 126, 1323 (1981).
- 42) Nishimura, T., Kozutsumi, H., & Hashimoto, Y., *Thymus*, 6, 225 (1984).
- 43) Sabato, G.D., *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 79, 3020 (1982).
- 44) Clark-Lewis, I., & Schrader, J.W., *J.Immunol.*, 128, 175 (1982).
- 45) Canter, H., & Boyse, E.A., *J.Exp.Med.*, 141, 1376 (1975).
- 46) Kruisbeek, A.M., Zujista, T.J., & Krose, T.J.M., *J.Immunol.*, 125, 955 (1980).
- 47) Bodeker, B.G.D., van Eijk, R.V.W., & Muhlradt, P.F., *Eur.J. Immunol.*, 10, 702 (1980).
- 48) Nishimura, T., Kozutsumi, H., & Hashimoto, Y., *Thymus*, 6, 235 (1984).
- 49) Colon, P.J., Henney, C.S., & Gillis, S., *J.Immunol.*, 128, 797 (1982).
- 50) Shortman, K., Boehmer, H.V., Lipp, J., & Hopper, K., *Transplant Rev.*, 25, 143 (1975).
- 51) Kruisbeek, A.M., & Astaldi, G.C.B., *J.Immunol.*, 123, 984 (1979).
- 52) Roelants, G.E., London, J., Mayor-Withay, K.S., & Serrano, B., *J. Immunol.*, 9, 139 (1979).
- 53) Mcphee, D., Pye, J., & Shortman, K., *Thymus*, 1, 151 (1979).

- 54) North, R.J., & Bursucker, I., J.Exp.Med., 159, 1295 (1984).
- 55) Fujimoto, S., Green, M.I., & Sehon, A.A., J.Immunol., 116, 791 (1976).
- 56) Fujimoto, S., Green, M.I., & Sehon, A.A., J.Immunol., 116, 800 (1976).
- 57) Poste, G., Kirsh, R., Fogler, E., & Fidler, I.J., Cancer Res., 39, 881 (1979).
- 58) Kleinerman, E.S., Erickson, K.L., Schroit, A.J., Fogler, W.E., & Fidler, J., Cancer Res., 43, 2010 (1983).
- 59) Barlozzari, T., Leonardt, J., Wiltront, R., Herberman, R.B., & Reynolds, W., J.Immunol., 134, 2783 (1985).
- 60) Grimm, E.A., Ramsey, K.M., Mazumder, A., Wilson, D.J., Djeu, J.Y., & Rosenberg, S.A., J.Exp.Med., 157, 884 (1983).
- 61) Grimm, E.A., Robb, R.J., Roth, J.A., Neckers, L.M., Lachman, L.B., Wilson, D.J., & Rosenberg, S.A., J.Exp.Med., 158, 1356 (1983).
- 62) Lotze, M.T., Grimm, E.A., Mazumder, A., Strausser, J.L., & Rosenberg, S.A., Cancer Res., 41, 4420 (1981).
- 63) Rosenstein, M., Yron, I., Kaufman, Y., & Rosenberg, S.A., Cancer Res., 44, 1946 (1984).
- 64) Hapel, J., Lee, J.C., Farraa, W.L., & Ihel, J.N., Cell, 25, 179 (1981).
- 65) Ihel, J.N., Perpersack, L., & Rebar, L., J.Immunol., 126, 2184 (1981).
- 66) Nishimura, T., & Hashimoto, Y., Gann, 75, 177 (1984)
- 67) Thomas, D.W., & Shevach, E.M., J.Exp.Med., 144, 1263 (1976).
- 68) Treves, A.J., Immunol.Rev., 40, 205 (1978).
- 69) Farrar, W.I., Johnson, H.M., & Farrar, J.J., J.Immunol., 126, 1120 (1981).
- 70) Itoh, K., Shiba, K., Shimizu, Y., Suzuki, R., & Kumagai, K., J. Immunol., 134, 3124 (1985).

- 71) Nishimura, T., & Hashimoto, Y., Medical Tribune, 30, 33 (1984).
- 72) Hashimoto, Y., & Sudo, H., Gann, 59, 7 (1968).
- 73) Goldstein, P., & Smith, E.T., Eur.J.Immunol., 6, 31 (1976).
- 74) Henney, C.S., Immunology today, 1, 36 (1980).
- 75) 橋本嘉幸, 西村孝司, 日本臨床, 37, 184 (1979).
- 76) 橋本嘉幸, 西村孝司, 臨床免疫, 13, 98 (1981).
- 77) Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kurzinger, K., & Springer, T.A., J.Immunol., 127, 590 (1981).
- 78) Kurzinger, K., Reynolds, T., Germain, R.N., Danignon, D., Marz, E., & Springer, T.A., J.Immunol., 127, 596 (1981).
- 79) Kurzinger, K., Ho, M.K., & Springer, T.A., Nature (London), 296, 668 (1982).
- 80) Podack, E.R., Immunology today, 6, 21 (1985).
- 81) Henkart, P.A., Millard, P.J., Reynolds, C.W., & Henkart, M., J.Exp. Med., 160, 75 (1984).
- 82) Nishimura, T., Yagi, H., Yagita, H., Uchiyama, Y., & Hashimoto, Y., Cell.Immunol., 94, 122 (1985).
- 83) 西村孝司, 橋本嘉幸, 最新医学, 40, 12 (1985).
- 84) 西村孝司, 橋本嘉幸, Medical Immunology, 9, 768 (1985).
- 85) Suzuki, R., Handa, K., Itoh, K., & Kumagai, K., J.Immunol., 130, 981 (1983).
- 86) 西村孝司, 橋本嘉幸, 癌とB R M, サイエンスフォーラム社, p.325 (1982).
- 87) 西村孝司, 橋本嘉幸, 医薬ジャーナル, 19, 51 (1983).
- 88) Wagner, H.C., Hart, K., Heeg, M., Rollinghoff, M., & Pfizenmaier, K., Nature, 284, 278 (1980).
- 89) Nishimura, T., Uchiyama, Y., Yagi, H., & Hashimoto, Y., J.Immunol. Meth., 78, 239 (1985).
- 90) Donohue, J.H., & Rosenberg, S.A., J.Immunol., 130, 2203 (1983).
- 91) Donohue, J.H., Lotze, M.T., Robb, R.J., Rosenstein, M., Braziel,

- R.M., Jaffe, E.S., & Rosenberg, S.A., *Cancer Res.*, 44, 1380 (1984).
- 92) Donohue, J.H., Rosenstein, M., Chang, A.E., Lotze, M.T., Robb, R.J., & Rosenberg, S.A., *J.Immunol.*, 132, 2123 (1984).
- 93) Pizza, G., Severini, G., Menntti, D., Vinci, C.-D., & Corrado, F., *Int.J.Cancer*, 34, 359 (1984).
- 94) 西村孝司, 橋本嘉幸, 免疫薬理, 3, 224 (1985).
- 95) Nishimura, T., Uchiyama, Y., Yagi, H., & Hashimoto, Y., *J. Immunol.Meth.* submitted.
- 96) 西村孝司, *Oncologia*, 13, 118 (1985).
- 97) 西村孝司, 橋本嘉幸, 免疫薬理, 3, 136 (1985).
- 98) Nishimura, T., Togashi, Y., Goto, M., Yagi, H., Uchiyama, Y., & Hashimoto, Y., *Cancer Immunol.Immunother.*, in press.
- 99) Mazumder, A., & Rosenberg, S.A., *J.Exp.Med.*, 159, 495 (1984).
- 100) Mule, J.J., Shu, S., Schwarz, S.L., & Rosenberg, S.A., *Science*, 28, 1487 (1984).
- 101) Berend, M.J., & North, R.J., *J.Exp.Med.*, 151, 69 (1980).
- 102) Greenberg, P.D., Cheever, M.A., & Fefer, A., *J.Exp.Med.*, 154, 952 (1981).
- 103) North, R.J., *J.Exp.Med.*, 155, 1063 (1982).
- 104) Bursuker, I., & North, R.J., *J.Exp.Med.*, 159, 1312 (1984).
- 105) Goto, M., Mitsoka, A., Sugiyama, M., & Kitano, M., *J.Exp.Med.*, 154, 204 (1981).
- 106) Chiba, K., Nishimura, T., & Hashimoto, Y., *J.Immunol.*, 134, 1019 (1985).
- 107) Chiba, K., Nishimura, T., & Hashimoto, Y., *J.Immunol.*, 134, 1026 (1985).
- 108) Hashimoto, Y., & Sudo, H., *Gann*, 62, 139 (1971).
- 109) Saito, M., Ebina, T., Koi, M., Yamaguchi, T., Kawade, Y., & Ishida, N., *Cell.Immunol.*, 68, 187 (1982).

- 110) Kohler, G.T., & Milstein, C., Nature (London), 277, 680 (1975).
- 111) Mitchell, K.F., Fabrer, J.P., Steplewsky, Z., & Koprowski, H.,
Mol.Immunol., 18, 207 (1981).
- 112) Laemmli, U.K., Nature (London), 227, 680 (1970).